



# Optimisation de la réponse aux thiopurines par la pharmacogénétique : approches in vitro et cliniques

Laurent Chouchana

## ► To cite this version:

Laurent Chouchana. Optimisation de la réponse aux thiopurines par la pharmacogénétique : approches in vitro et cliniques. Pharmacologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P616 . tel-01130339

**HAL Id: tel-01130339**

**<https://theses.hal.science/tel-01130339>**

Submitted on 11 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE PARIS DESCARTES

**Ecole doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries**

*INSERM UMR-S 1147 « MEPPOT »*

*« Médecine Personnalisée, Pharmacogénomique et Optimisation Thérapeutique »*

## THESE DE DOCTORAT DE PHARMACOLOGIE

présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 2014

par

Laurent CHOUCHANA

Optimisation de la réponse aux thiopurines par la  
pharmacogénétique : approches *in vitro* et cliniques

### JURY

Madame le Professeur Roselyne BOULIEU

Rapporteur

Madame le Professeur Delphine ALLORGE

Rapporteur

Madame le Docteur Céline VERSTUYFT

Examineur

Monsieur le Professeur Xavier ROBLIN

Examineur

Monsieur le Docteur David GURWITZ

Examineur

Madame le Professeur Marie-Anne LORIOT

Directeur de Thèse



*à Judith*

*à Jonas*





# Remerciements

---

## Professeur Marie-Anne Lorient

Qui a encadré et dirigé ce travail de thèse. Merci pour ton encadrement tout au long de cette thèse, tes conseils, tes connaissances, ta disponibilité, ton soutien, ta sympathie et surtout ta confiance dès le début... à la fin de mon internat en pharmacie. Le chemin de cette thèse n'a pas toujours été facile mais l'aboutissement est là. Trouve ici l'expression de mon estime et de ma sympathie.

## Professeur Philippe Beaune

Qui a dirigé notre groupe de recherche au laboratoire et suivi la progression de ce travail. Merci pour tes conseils, ta sympathie, tes idées (encore et toujours), ton accessibilité, ta rigueur, et pour m'avoir permis d'accéder à des opportunités professionnelles ultérieures. Trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

## Professeur Roselyne Boulieu

## Professeur Delphine Allorge

Merci pour le temps consacré à examiner ce travail et de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse et de siéger dans ce jury.

## Professeur Xavier Roblin

Merci de m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury de thèse. Merci pour tes connaissances sur les thiopurines, tes conseils et ta sympathie.

## Docteur Céline Verstuyft

Merci de m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury de thèse, et de m'apporter tes conseils et ton expérience. J'étais loin d'imaginer, près de 10 ans après notre première rencontre lors d'une garde à l'hôpital Bicêtre où j'étais un jeune interne en pharmacie, que tu serais dans ce jury pour juger mon travail de recherche.

## Docteur David Gurwitz

Thank you for giving me the honor of being part of this thesis jury. Many thanks for your help at every moment, your availability, your kindness, your scientific advices and your infallible knowledge on lymphoblastoid cell lines. I will be pleased to work with you on further collaborations.

## Professeur Pierre Laurent-Puig

Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de recherche durant ces trois années de thèse où j'ai beaucoup appris. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

A toutes les personnes qui ont contribué à ce travail et sans qui il n'aurait pas été possible

Docteur Jean-Louis Golmard, merci pour tes analyses et « consultations statistiques » à la Pitié, ainsi que pour ton professionnalisme.

Professeur Frank Ruemmele, merci d'avoir permis la réalisation de REFAZAME dans votre service et d'avoir été enthousiaste dès les premiers instants de ce projet ; merci aussi à Sandrine Urdiel pour son très efficace soutien logistique.

Merci à toute l'équipe de l'URC Paris Centre, notamment au Professeur Jean-Marc Tréluyer et à Valérie Jolaine pour leurs qualités professionnelles et sans qui l'étude REFAZAME n'aurait pas été possible dans les délais impartis.

Merci à toute l'unité de pharmacogénétique de l'HEGP notamment au Docteur Denis Roche et au Docteur Céline Narjoz pour nos discussions enrichissantes sur la TPMT ; merci aussi à Sabira Deshaies pour les dosages enzymatiques dans les cellules.

Merci à toute l'équipe bioinformatique de l'HEGP, notamment à Antoine Neuraz, au Docteur Paul Avillach et au Professeur Anita Burgun de m'avoir permis de contribuer au premier PheWAS français. Cette expérience a été très enrichissante.

Merci à l'URC de l'HEGP, notamment à Brigitte Pineau et au Professeur Gilles Chatellier pour leur aide pour la constitution de la base de données pharmacogénétiques.

Merci à la plate-forme de génomique de l'Institut Cochin, notamment à Florent Dumont, à Sébastien Jacques et au Docteur Franck Letourneur pour leur travail sur les puces à ADN et leur professionnalisme.

Merci au Docteur Irène Ceballos pour nous avoir permis de travailler sur les précieuses lignées cellulaires provenant de patients Lesch-Nyhan.

Enfin et surtout, un grand merci à Catherine Marchetti, Ana Fernández-Ramos pour leur aide précieuse au laboratoire et leur participation à ce travail, ainsi qu'à toutes les personnes au laboratoire qui m'ont aidé et conseillé au quotidien.

**Résumé :** Les thiopurines sont des médicaments cytotoxiques et immunosuppresseurs largement prescrits, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Ils représentent l'un des meilleurs exemples d'application clinique de la pharmacogénétique avec le dépistage du déficit en thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), enzyme clé du métabolisme des thiopurines. La variabilité interindividuelle de la réponse à ces médicaments rend nécessaire leur optimisation thérapeutique. Ce travail de thèse a d'une part, analysé les relations entre activité TPMT et concentrations des métabolites thiopuriniques, et d'autre part, recherché des facteurs associés à la résistance aux thiopurines. A l'aide d'une base de données pharmacogénétiques hospitalière et d'une étude « PheWAS » à partir d'un entrepôt de données cliniques, nous avons analysé la distribution et la corrélation génotype-phénotype pour la TPMT, en lien avec les concentrations des métabolites thiopuriniques. Nous avons observé qu'une activité TPMT très élevée (phénotype « ultra-rapide ») était associée à des paramètres clinico-biologiques reflétant une maladie évolutive et un traitement inefficace dans les MICI. De plus, une étude clinique rétrospective dans les MICI pédiatriques a permis d'identifier des facteurs associés à la lymphopénie observée sous thiopurines. Enfin, à partir d'un modèle *in vitro* fondé sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) sélectionnées, nous avons établi une signature transcriptomique, incluant 32 gènes, prédictive de la résistance aux thiopurines. Une analyse fonctionnelle bioinformatique a abouti à l'identification de voies métaboliques liées à la protéine p53 et au cycle cellulaire, ainsi que des mécanismes moléculaires associés à la résistance aux thiopurines. En conclusion, ce travail de thèse, qui a exploré la variabilité de réponse aux thiopurines et tout particulièrement la résistance à ces médicaments, propose des hypothèses pour l'individualisation et l'optimisation thérapeutique des thiopurines.

**Mots clés :** thiopurines, thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), optimisation thérapeutique, résistance thérapeutique, pharmacogénomique, PheWAS, lignées cellulaires lymphoblastoïdes

**Abstract:** Thiopurines are cytotoxic and immunosuppressive drugs widely prescribed, mainly in inflammatory bowel disease (IBD). They constitute one of the best success story of pharmacogenetic implementation into clinical practice based on the screening of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) deficiency, a key enzyme in thiopurine metabolism. Optimization of thiopurine response is challenging because of its large interindividual variability such as inefficacy and toxicities. This thesis has explored, on one hand, the relationships between TPMT activity and metabolite concentrations, and on the other hand, factors associated with thiopurine inefficacy. Using a primary care pharmacogenetic database, we first analyzed TPMT distribution and genotype-phenotype correlation, in relation with thiopurine metabolites in a large population. Using a PheWAS study based on a clinical data warehouse we then reported that a very high TPMT activity ("ultra-rapid" phenotype) was associated with parameters of active IBD and poor response to thiopurines. Furthermore, a retrospective study in pediatric IBD identified factors predicting the occurrence of lymphopenia during thiopurine therapy. Finally, using a lymphoblastoid cell line (LCL) *in vitro* model, we established a transcriptomic signature, including 32 genes predicting thiopurine cellular resistance. A bioinformatic functional analysis identified metabolic pathways in relation with p53 and cell cycle, as well as molecular mechanisms associated with thiopurine resistance. To conclude, this research work, focusing on the variability of thiopurine response and mainly therapeutic resistance, provides new hypotheses to individualize and optimize therapeutic response to thiopurines.

**Keywords:** thiopurines, thiopurine S-methyltransferase (TPMT), drug optimization, therapeutic resistance, pharmacogenomics, PheWAS, lymphoblastoid cell lines



# Table des matières

---

Composition du Jury .....	5
Liste des publications .....	7
Collaborations scientifiques.....	9
Liste des Abréviations .....	11
Liste des Illustrations .....	12
Liste des Tables .....	13
Avant-propos.....	17
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>19</b>
<b>Thiopurines .....</b>	<b>21</b>
1 UN PEU D'HISTOIRE.....	21
2 STRUCTURES CHIMIQUES ET PROPRIETES PHARMACEUTIQUES .....	27
2.1 Indications .....	28
2.2 Posologies.....	28
3 PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES.....	29
3.1 Pharmacocinétique.....	29
3.1.1 Absorption et effet de premier passage.....	29
3.1.2 Distribution .....	30
3.1.3 Métabolisme et élimination.....	32
3.2 Pharmacodynamie.....	33
3.3 Pharmacogénétique .....	36
3.3.1 Définitions .....	36
3.3.2 Historique.....	36
3.3.3 Applications cliniques .....	39
3.3.4 Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) .....	40
4 REPONSE CLINIQUE.....	50
4.1 Efficacité/Résistance .....	50
4.1.1 Efficacité clinique .....	50
4.1.2 Optimisation de l'efficacité.....	53
4.1.3 Associations thérapeutiques potentialisatrices des 6-TGN.....	57
4.2 Toxicité hématologique.....	62
4.2.1 Clinique .....	62
4.2.2 Prévention de la toxicité hématologique .....	63
4.3 Toxicité hépatique .....	66
4.3.1 Clinique .....	66
4.3.2 Prévention des toxicités hépatiques.....	68
4.4 Toxicité pancréatique.....	70
4.4.1 Clinique .....	70
4.4.2 Prévention de la toxicité pancréatique .....	71
4.5 Intolérance gastro-intestinale .....	72

4.5.1 Clinique .....	72
4.5.2 Prévention de l'intolérance gastro-intestinale .....	72
4.6 Néoplasies.....	73
5 RECOMMANDATIONS THERAPEUTIQUES INTEGRANT LA PHARMACOGENETIQUE ET LE SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE.....	74
5.1 Initiation d'un traitement par thiopurine .....	74
5.2 Patients en cours de traitement par thiopurine .....	77
6 AUTRES FACTEURS PHARMACOGENETIQUES .....	79
6.1 Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) .....	79
6.2 Glutathion S-transférases (GST) .....	81
6.3 Xanthine oxydase (XO) .....	82
6.4 Aldéhyde oxydase (AOX) .....	82
6.5 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) .....	83
6.6 Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) .....	84
6.7 Inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH).....	85
6.8 ATP-binding cassette sub-family C member (ABCC4).....	85
<b>Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....</b>	<b>87</b>
1 DEFINITION ET ETIOLOGIE .....	87
2 PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES MICI .....	88
2.1 Anti-inflammatoires coliques .....	89
2.1.1 Aminosalicylés.....	89
2.1.2 Corticoïdes locaux par voie rectale.....	90
2.2 Corticoïdes systémiques.....	91
2.3 Antibiotiques .....	92
2.4 Immunosuppresseurs.....	92
2.4.1 Thiopurines .....	92
2.4.2 Anti-TNF .....	94
2.4.3 Méthotrexate .....	98
2.4.4 Ciclosporine et tacrolimus .....	98
3 CRITERES D'EVALUATION DE L'ACTIVITE DANS LES MICI .....	100
3.1 Critères cliniques .....	100
3.2 Critères endoscopiques .....	101
3.3 Critères biologiques.....	102
3.3.1 CRP sérique .....	102
3.3.2 Protéines fécales : lactoferrine et calprotectine .....	103
3.3.3 Anticorps sériques : ASCA et pANCA .....	104
<b>Lignées cellulaires lymphoblastoïdes.....</b>	<b>106</b>
1 HISTORIQUE .....	106
2 CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES LIGNEES CELLULAIRES LYMPHOBLASTOÏDES .....	107
3 BANQUES DE LIGNEES CELLULAIRES LYMPHOBLASTOÏDES .....	109
4 APPLICATIONS EN RECHERCHE .....	112
5 MODELE PHARMACOGENOMIQUE <i>IN VITRO</i> .....	115
5.1 Caractéristiques et intérêts.....	115
5.2 Limites du modèle .....	116

<u>OBJECTIFS.....</u>	<u>119</u>
<u>TRAVAUX DE RECHERCHE .....</u>	<u>123</u>
Article 1 .....	125
Article 2 .....	133
Article 3 .....	157
Article 4 .....	209
Article 5 .....	243
<u>DISCUSSION GENERALE.....</u>	<u>257</u>
1 OPTIMISATION THERAPEUTIQUE DES THIOPURINES .....	260
2 NOUVELLES APPROCHES POUR DE PREDICTION DE LA REPONSE AUX MEDICAMENTS .....	270
3 CONCLUSION GENERALE : L'AVENEMENT DE LA PHARMACOGENOMIQUE ?.....	277
<u>ANNEXES .....</u>	<u>279</u>
Annexe 1 – tests pharmacogénétiques.....	280
Annexe 2 – lettre à l'Editeur dans <i>J Crohns Colitis</i> .....	282
Annexe 3 – revue de la littérature dans <i>Aliment Pharmacol Ther</i> .....	284
Annexe 4 – revue de la littérature dans <i>La Lettre du Pharmacologue</i> .....	314
Annexe 5 – avis CPP base de données pharmacogénétiques.....	320
Annexe 6 – accord de transfert de matériel biologique LCL.....	322
Annexe 7 – protocole REFAZAME .....	328
Annexe 8 – avis CPP REFAZAME.....	346
<u>BIBLIOGRAPHIE .....</u>	<u>349</u>





# Composition du Jury

---

---

**Directeur de thèse** Madame Marie-Anne Lorient

Université : Université Paris Descartes

Adresse : INSERM UMR-S 1147, Centre Universitaire des Saints-Pères – 45 rue des Saints-Pères  
Code postal : 75006 Ville : Paris

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐

Professeur des Universités

☐

Directeur de recherche

☒

PU-PH

☐

Chargé de recherche

☐

MCU

☐

Docteur (PhD)

☒

HDR

☐

Autre (*précisez*) :

---

**Rapporteur** Madame Roselyne Boulieu

Université : Université Lyon 1

Adresse : Pharmacocinétique Clinique, CHU de Lyon – 8 avenue Rockefeller  
Code postal : 69373 Ville : Lyon Cedex 08

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐

Professeur des Universités

☐

Directeur de recherche

☒

PU-PH

☐

Chargé de recherche

☐

MCU

☐

Docteur (PhD)

☒

HDR

☐

Autre (*précisez*) :

---

**Rapporteur** Madame Delphine Allorge

Université : Université Lille 2

Adresse : UF Toxicologie, Centre de Biologie Pathologie, CHRU de Lille – Boulevard du Pr. J. Leclercq  
Code postal : 59037 Ville : Lille cedex

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐

Professeur des Universités

☐

Directeur de recherche

☒

PU-PH

☐

Chargé de recherche

☐

MCU

☐

Docteur (PhD)

☒

HDR

☐

Autre (*précisez*) :

---

---

**Membre du jury** Madame Céline Verstuyft

Université : Université Paris Sud

Adresse: Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, CHU Bicêtre – 78 rue du General Leclerc

Code postal : 94275

Ville : Le Kremlin Bicêtre Cedex

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐ Professeur des Universités

☐ Directeur de recherche

☐ PU-PH

☐ Chargé de recherche

☒ MCU-PH

☐ Docteur (PhD)

☒ HDR

☐ Autre (*précisez*) :

---

**Membre du jury** Monsieur Xavier Roblin

Université : Université Jean Moulin Saint-Etienne

Adresse : Service de Gastroentérologie, Hôpital Nord, CHU Saint-Etienne

Code postal : 42055

Ville : Saint-Etienne Cedex 2

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐ Professeur des Universités

☐ Directeur de recherche

☐ PU-PH

☐ Chargé de recherche

☐ MCU

☐ Docteur (PhD)

☒ HDR

☒ Autre (*précisez*) : Professeur associé universitaire

---

**Membre du jury** Monsieur David Gurwitz

Université : Tel-Aviv University

Adresse : Department of Human Molecular Genetics & Biochemistry, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University

Code postal : 69978

Ville : Tel-Aviv, Israël

Qualité (*cochez la case correspondante*) :

☐ Professeur des Universités

☒ Directeur de recherche

☐ PU-PH

☐ Chargé de recherche

☐ MCU

☐ Docteur (PhD)

☐ HDR

☐ Autre (*précisez*) :

## Liste des publications

---

### **Article 1 (cas clinique)**

« Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? »

Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, Lorient MA. *Clin Chem*. 2013;59(7):1023-6.

*Impact factor : 7,1*

### **Article 2 (article original)**

« Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring »

Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, Beaune P, Lorient MA. *Pharmacogenomics*. 2014;15(6):745-57.

*Impact factor : 3,9*

### **Article 3 (article original)**

« Phenome-wide association studies on a quantitative trait: application to TPMT enzyme activity and thiopurine therapy in pharmacogenomics »

Neuraz A, Chouchana L, Malamut G, Le Beller C, Roche D, Beaune P, Degoulet P, Burgun A, Lorient MA, Avillach P. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(12):e1003405.

*Impact factor : 4,9*

### **Article 4 (article original soumis)**

« Molecular basis of thiopurine resistance based on LCL pharmacogenomic tool: identification of a transcriptomic signature »

Chouchana L, Fernández-Ramos A, Dumont F, Marchetti C, Beaune P, Gurwitz D, Lorient MA. *Mol Cancer Ther*. Soumis

*Impact factor : 5,6*

### **Article 5 (article original en préparation)**

Optimisation thérapeutique de l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en pédiatrie

**Article en Annexe 2 (lettre à l'Editeur)**

« TPMT status determination: the simplest is the most effective? »

Chouchana L, Narjoz C, Lorient MA. *J Crohns Colitis*. 2012;6(7):807.

*Impact factor : 3,4*

**Article en Annexe 3 (revue de la littérature), suivi de 2 réponses de Lettre à l'Editeur**

« Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease »

Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(8):967-9.

*Impact factor : 4,5*

« Letter: thiopurine blood monitoring for patients with inflammatory bowel disease – authors' reply ». *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):742-3.

« Letter: TPMT activity and age in IBD patients – authors' reply ». *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):742-3.

**Article en Annexe 4 (revue de la littérature)**

« Pharmacogénétique des thiopurines »

Chouchana L, Lorient MA. *La Lettre du Pharmacologue*. 2013;27(3):72-5.

## Collaborations scientifiques

---

**Docteur Céline Narjoz, Docteur Denis Roche, Professeur Marie-Anne Lorient, Professeur Philippe Beaune**

Unité fonctionnelle de Pharmacogénétique et oncologie moléculaire, Service de biochimie  
Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP

*Rôle : production des données pharmacogénétiques pour l'étude sur la base de données*

**Brigitte Pineau, Professeur Gilles Chatellier**

Département d'Informatique médicale et de santé publique  
Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP

*Rôle : extraction des données biologique du serveur du laboratoire et aide à la conception de la base de données pharmacogénétiques*

**Professeur Frank Ruemmele**

Service de Gastroentérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques  
Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP

*Rôle : prise en charge des patients pédiatrique et aide à la conception de l'étude REFAZAME*

**Valérie Jolaine, Fabrice Gourmelon, Professeur Jean-Marc Tréluyer**

Unité de Recherche Clinique Paris Descartes Necker Cochin  
Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP

*Rôle : mise en place du protocole REFAZAME ; recueil, saisie et gestion des données cliniques*

**Docteur Jean-Louis Golmard**

Département de Biostatistiques  
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, AP-HP

*Rôle : analyses statistiques (modèle multivarié) de la base de données pharmacogénétiques ; analyses statistiques de l'étude REFAZAME*

**Antoine Neuraz, Docteur Paul Avillach, Professeur Anita Burgun**

UMR-S 872 Equipe 22 « Information sciences to support personalized medicine »  
INSERM, Université Paris Descartes

*Rôle : analyse bioinformatique de l'entrepôt de données cliniques ; conception de l'étude PheWAS*

**Docteur David Gurwitz**

National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations, Sackler Faculty of Medicine  
Tel-Aviv University

*Rôle : production des LCL et importation du modèle au laboratoire ; conseils scientifiques*

**Florent Dumont, Sébastien Jacques, Docteur Franck Letourneur**

Plate-forme de Génomique, UMR-S 1016 - Institut Cochin  
INSERM, Université Paris Descartes

*Rôle : hybridation et analyse bioinformatique des puces transcriptomiques*

**Docteur Irène Ceballos-Picot**

Service de Biochimie métabolique  
Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP

*Rôle : obtention des lignées LCL de patients Lesch-Nyhan*

## Liste des Abréviations

---

6-Me-8OH-MP : 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine	HR: <i>hazard ratio</i>
6-MeTIMP: 6-méthylthioinosine monophosphate	ICD: <i>international classification diseases</i>
6-MMP : 6-méthylmercaptapurine	IDP : inosine diphosphate
6-MMPN : 6-méthylmercaptapurine nucléotides	IMP : inosine monophosphate
6-MP : 6-mercaptapurine	IMPDH : inosine 5'-monophosphate déshydrogénase
6-TG : 6-thioguanine	IMPDH : inosine monophosphate déshydrogénase
6-TGDP : 6-thioguanosine diphosphate	ITP : inosine triphosphate
6-TGMP : 6-thioguanosine monophosphate	ITPA : inosine triphosphate pyrophosphatase
6-TGN : 6-thioguanine nucléotides	LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
6-TGTP : 6-thioguanosine triphosphate	LCL : lignées cellulaires lymphoblastoïdes
6-TIMP : 6-thioinosine monophosphate :	MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
ADN : acide désoxyribonucléique	MMR : mismatch repair
ADNmt : ADN mitochondrial	MTHFR : 5,10-méthylène-tétrahydrofolate réductase
AMM : autorisation de mise sur le marché	MTHFR : 5,10-Méthylène-tétrahydrofolate réductase
AOX : aldéhyde oxydase	NDPK : nucléoside diphosphate kinase
ARN : acide ribonucléique	OR : odds ratio
ASCA : anticorps anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pANCA : <i>perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
ATP : adénosine-5'-triphosphate	PheWAS : <i>phenome-wide association study</i>
AVK : antivitamine K	PMSI : programme médicalisé des systèmes d'information
CDW : <i>clinical data warehouse</i>	PPAT : phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransférase
CIM: Classification Internationale des Maladies	PRPP : phosphoribosylpyrophosphate
CIPC : <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>	RCH : rectocolite hémorragique
CRP : <i>C-reactive protein</i>	RCP : résumé des caractéristiques du produit
EBV Epstein-Barr virus	RR : risque relatif
EHR : <i>electronic health record</i>	SAM : <i>S</i> -adénosyl <i>L</i> -méthionine
EMA : <i>European medicines agency</i>	SIH : système d'information hospitalier
eQTL : <i>expression quantitative trait loci</i>	SNP : <i>single nucleotide polymorphism</i>
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	STP : suivi thérapeutique pharmacologique
GAP : <i>GTPase-activating protein</i>	TNF : <i>tumor necrosis factor</i>
GDI : <i>guanine nucleotide exchange inhibitor</i>	TPMT : thiopurine <i>S</i> -méthyltransférase
GDP : guanosine diphosphate	VNTR : <i>variable number tandem repeat</i>
GEF : <i>guanine nucleotide exchange factor</i>	VPN : valeur prédictive négative
GMP : guanosine monophosphate	VPP : valeur prédictive positive
GMPS : guanosine monophosphate synthétase	XO : xanthine oxydase
GO : <i>Gene Ontology</i>	
GR : globules rouges	
GST : glutathion <i>S</i> -transférase	
GTP : guanosine triphosphate	
GWAS : <i>genome-wide association study</i>	
HNR : hyperplasie nodulaire régénérative	
HPRT : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase	



## Liste des Illustrations

---

FIGURE 1. Structures chimiques de la purine et des thiopurines.....	27
FIGURE 2. Métabolisme des thiopurines.....	31
FIGURE 3. Cycle des RhoGTPases .....	34
FIGURE 4. Mécanisme d'action moléculaire du 6-TGTP .....	35
FIGURE 5. Enzymes du métabolisme des médicaments en fonction de leur importance relative.....	39
FIGURE 6. Réaction de méthylation catalysée par la TPMT .....	41
FIGURE 7. Distribution trimodale de l'activité TPMT .....	42
FIGURE 8. Variants alléliques du gène <i>TPMT</i> les plus fréquents chez les caucasiens .....	47
FIGURE 9. Méta-analyses de l'efficacité des thiopurines <i>versus</i> placebo, réalisées par la Cochrane Collaboration.....	51
FIGURE 10. Méta-analyse de la rémission clinique dans les MICI en fonction de concentrations en 6-TGN supérieures à un seuil prédéfini.....	55
FIGURE 11. Algorithme de prise en charge thérapeutique des patients sous thiopurine dans les MICI en fonction de la TPMT et des 6-TGN/6-MMPN .....	76
FIGURE 12. Génération de lignées cellulaires lymphoblastoïdes.....	107
FIGURE 13. Méthodologie de mise en place d'étude pharmacogénomique basée sur un entrepôt de données cliniques couplé à une biobanque .....	275
FIGURE 14. Evolution des coûts du séquençage d'un génome humain .....	278

## Liste des Tables

---

TABLEAU 1. Nomenclature des allèles <i>TPMT</i> et description des polymorphismes génétiques connus.....	45
TABLEAU 2. Indications des thiopurines dans les MICI selon les recommandations européennes de l'ECCO .....	93
TABLEAU 3. Caractéristiques des anti-TNF utilisés dans les MICI .....	94
TABLEAU 4. Principaux scores utilisés pour évaluer l'efficacité des traitements dans les MICI.....	101
TABLEAU 5. Principaux biomarqueurs biologiques utilisés dans les MICI.....	103
TABLEAU 6. Biobanques de lignées cellulaires lymphoblastoïdes à travers le monde .....	110
TABLEAU 7. Exemples d'études de pharmacogénomique réalisées <i>in vitro</i> à l'aide de lignées cellulaires lymphoblastoïdes.....	114



*“Le remède est pire que la maladie”*

Francis Bacon [1561-1626]

Philosophe



# Avant-propos

---

La variabilité de la réponse aux médicaments, souvent difficile à appréhender, est à l'origine d'une importante iatrogénie. Aux Etats-Unis, on estime que les effets indésirables causent ou contribuent à 6-7 % des hospitalisations, à une augmentation de deux jours de la durée moyenne des hospitalisations et surtout à plus de 100 000 décès par an, pouvant coûter à la société plus cher que les traitements médicamenteux eux-mêmes [LAZAROU *et al.* 1998]. En France, les statistiques sont à peu près équivalentes, la iatrogénie médicamenteuse étant à l'origine d'environ 10 % des hospitalisations et représentant plus 130 000 admissions par an [POUYANNE *et al.* 2000]. Certaines classes médicamenteuses sont particulièrement iatrogènes, comme les anti-vitamines K (AVK), représentant à eux seuls 17 000 hospitalisations par an et 5 000 accidents hémorragiques d'évolution fatale (données : ANSM). Par ailleurs, la résistance au traitement est également un versant de la variabilité de la réponse aux médicaments. Largement moins étudiée que les effets indésirables, la résistance au traitement n'est pas moins un problème majeur, parfois aussi coûteux pour la société que les toxicités, notamment pour certains médicaments à prix élevé [RODEN & GEORGE 2002]. Ainsi, un nombre important de patients n'a pas de réponse efficace à un traitement médicamenteux. Dans le cas des thiopurines, on estime, qu'après une durée de traitement entre 6 mois et de 2 ans, 30 à 40 % des patients ne sont pas répondeurs dans l'indication du maintien de la rémission dans les MICI [PREFONTAINE *et al.* 2009; TIMMER *et al.* 2012].

L'optimisation thérapeutique est donc un enjeu majeur de santé publique dont les conséquences économiques sont importantes pour la société. Au niveau individuel, l'amélioration de la balance bénéfice/risque est un défi dont dépend la réussite du traitement. Les préoccupations éthiques sont évidentes : ne pas exposer un patient à un risque d'effets indésirables, ou plutôt réduire ce risque au maximum – « *Primum non nocere* », disait Hippocrate – et proposer le traitement le plus efficace, ou plutôt avec la balance bénéfice/risque la plus favorable à niveau individuel – c'est dans cette dernière notion d'individualisation du risque que réside tout l'enjeu de la médecine personnalisée.

L'exploration de la variabilité inter-individuelle est un des fondements de l'optimisation thérapeutique. Les sources de variabilité dans la réponse aux médicaments sont multiples et plurifactorielles. La réponse aux médicaments est le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et d'interactions gène-environnement [HANSEN *et al.* 2009]. Une part significative de la variabilité peut être attribuée à des facteurs génétiques modulant la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamie [GERVASINI *et al.* 2010]. Ainsi, le rationnel sous-jacent à la pharmacogénétique est de prendre en compte et d'étudier les gènes codant pour les transporteurs de médicaments, les enzymes du métabolisme et les cibles pharmacodynamiques afin de prédire l'effet d'un médicament. En outre, lorsque les conditions pour un médicament donné – (i) concentration plasmatique ou sanguine corrélée avec celle présente au niveau de la cible et (ii) relation concentration/efficacité ou effet indésirable – sont réunies, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est complémentaire de l'approche prédictive des tests pharmacogénétiques. C'est un outil utile pour le phénotypage de la pharmacocinétique d'un patient constituant une aide à l'individualisation des posologies et à la prise de décision thérapeutique. Sachant qu'il est assez difficile de distinguer l'influence des facteurs environnementaux des facteurs génétiques comme sources de variabilité dans la réponse aux médicaments, la combinaison du STP et du génotypage des capacités métaboliques pour un médicament donné constitue actuellement la façon la plus aboutie d'individualiser la posologie des médicaments dont les effets cliniques sont difficiles à évaluer ou dont les marges thérapeutiques sont étroites [GERVASINI *et al.* 2010]. On peut citer par exemple le cas des thiopurines (*TPMT* et dosage des métabolites 6-TGN/6-MMPN), des AVK (*CYP2C9*, *VKORC1* et détermination de l'INR), du tacrolimus (*CYP3A5* et dosage sanguin) ou encore des antidépresseurs tricycliques (*CYP2D6* et dosage plasmatique).

Enfin, cette thèse sur l'optimisation thérapeutique à l'aide d'approches pharmacogénétiques est finalement la suite logique d'un internat en pharmacie dont l'une des principales motivations était la réduction de la iatrogénie médicamenteuse. Elle est l'aboutissement d'un parcours hospitalier, débuté il y a une dizaine d'années, autour de la pharmacie clinique – avec l'aide à la prescription –, de l'évaluation thérapeutique et de la pharmacologie – avec le suivi STP et la pharmacogénétique, le tout en lien avec les cliniciens.

# RAPPELS

# BIBLIOGRAPHIQUES

---





# Thiopurines

---

La classe pharmacologique des thiopurines est actuellement représentée par trois médicaments : la 6-mercaptopurine (6-MP, Purinethol®), l'azathioprine (Imurel®) et la 6-thioguanine (6-TG, Lanvis®). Ces médicaments, dotés de propriétés cytotoxiques et immunosuppressives, ont été développés au milieu du siècle dernier par Gertrude B. Elion et George H. Hitchings [ELION *et al.* 1951]. Ces molécules, qui ont révolutionné la chimiothérapie moderne, leur ont valu le Prix Nobel de Médecine en 1988.

## 1 Un peu d'histoire...

### ➤ *Gertrude B. Elion, une femme prédestinée à la recherche ?*

Fille d'immigrants juifs de Russie et de Lituanie, Gertrude Belle Elion est née à New-York en janvier 1918. Jeune fille passionnée par les sciences, la mort douloureuse de son grand-père des suites d'un cancer gastrique s'est avéré être un des facteurs décisifs pour sa carrière de chercheuse. « C'était comme si le signal était là : c'était la maladie contre laquelle il fallait lutter » expliquera-t-elle plus tard. Son intérêt pour résoudre les mystères de la science fut intensifié avec la mort de son fiancé en 1941, à la suite d'une endocardite bactérienne, puis quelques années plus tard, de sa mère, des suites d'un cancer du col de l'utérus. Gertrude Elion était alors pleinement convaincue de la nécessité de trouver des traitements pour un grand nombre de maladies qui étaient jusque-là incurables.

### ➤ *Un brillant parcours universitaire*

Ainsi en 1933, à l'âge de 15 ans, ses bonnes notes obtenues au lycée lui permettent d'entrer au Hunter College à New-York pour y étudier la chimie. Malgré une crise économique sans précédent suite au krach boursier de 1929, la gratuité de l'enseignement supérieur *undergraduate* lui permet d'accéder à l'Université. A l'issue de

sa licence en 1937, elle décide de chercher du travail dans la recherche en chimie afin de pouvoir financer son doctorat. Cette démarche sera vaine et n'aboutira pas : nous sommes en pleine crise économique et, à cette époque, les rares emplois en laboratoire sont strictement réservés aux hommes. Elle accepte alors un travail d'assistant de laboratoire pour 20 \$ par semaine, ce qui lui permettra d'obtenir une première expérience. Avec ses maigres économies et l'aide de ses parents, elle entre à la New-York University en 1939. Pendant deux ans, elle travaille la journée en tant que standardiste ou professeur de lycée et occupe ses soirées et week-ends à ses recherches, qui lui permettront d'obtenir un Master en Sciences en 1941. La guerre et le manque de chimistes dans l'industrie pharmaceutique lui ont permis d'obtenir son premier poste dans le contrôle analytique pour une société agroalimentaire. La routine et l'ennui de ne plus rien apprendre l'amènent à postuler rapidement pour un autre travail. Sa candidature sera alors retenue au laboratoire pharmaceutique Burroughs-Wellcome – qui deviendra plus tard GlaxoSmithKline.

➤ *Le doctorat ou l'industrie ?*

C'est dans ce laboratoire que débute réellement sa carrière dans la recherche industrielle en tant qu'assistante du Docteur Georges Hitchings (1905-1998). Leur partenariat durera 40 ans et sera à l'origine de nombreuses découvertes majeures de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle.

Sa soif de connaissances et son intelligence séduisirent rapidement Georges Hitchings qui lui offrit de nombreuses responsabilités. De simple chimiste organicien, elle étend ses connaissances à la biochimie, la pharmacologie, l'immunologie et la virologie, afin de pouvoir émettre des hypothèses biologiques sur les molécules qu'elle synthétisait. Dans le même temps, toujours impatiente d'obtenir un doctorat, elle s'inscrit au Brooklyn Polytechnic Institute. Après deux ans de déplacements incessants entre son travail et le laboratoire, le doyen lui ordonne de choisir entre son doctorat à temps partiel ou son emploi chez Burroughs-Wellcome. C'est alors



Gertrude B. Elion dans son laboratoire au sein de Burroughs-Wellcome, à New-York en 1950

qu'elle prit, comme elle le dit elle-même, la décision centrale de sa vie, c'est-à-dire renoncer à sa volonté d'obtenir un doctorat. Des dizaines d'années plus tard, lorsqu'elle reçut le titre de Docteur *honoris causa* de trois grandes universités américaines, elle se dit qu'elle avait, probablement, fait le bon choix.

➤ *Des recherches prometteuses sur les purines*

Au sein des laboratoires Burroughs-Wellcome, Gertrude Elion avait été recrutée pour synthétiser et étudier des molécules du métabolisme des purines dans différents types cellulaires. L'objectif était d'inhiber sélectivement la synthèse des acides nucléiques dans les cellules à prolifération rapide, telles que dans les leucémies. A cette époque dans les années 1940, peu de choses étaient connues sur l'ADN. Neuf ans avant que James Watson et Francis Crick ne proposèrent la structure en double hélice de l'ADN, Gertrude Elion et George Hitchings étaient déjà en mesure de démontrer que l'inhibition de la synthèse de l'ADN dans les cellules tumorales, les bactéries ou les virus était possible en utilisant des analogues de nucléotides. Pour cela, leur stratégie de recherche était basée non pas sur une démarche scientifique classique mais plutôt en étudiant les différences entre cellules normales humaines et des agents pathogènes pour mettre au point des molécules antimétabolites bloquant les agents pathogènes ou les cellules cancéreuses. Cette méthodologie de recherche, fondée sur l'identification d'une cible moléculaire spécifique et la synthèse d'une molécule capable de l'inhiber, est novatrice par rapport aux stratégies jusqu'alors utilisées qui consistaient à tester de manière aléatoire un grand nombre de molécules à activité pharmacologique potentielle.

En 1948, Gertrude Elion synthétise la diaminopurine, un composé qui s'incorpore aux brins d'ADN et permet d'inhiber la croissance de bactéries *Lactobacillus casei*. Des études sur des souches de *L. casei* résistantes à la diaminopurine ont révélé l'incapacité de ces souches à proliférer dans des milieux où l'adénine est la seule source de purine – c'est-à-dire sans hypoxanthine. Elle en déduit ainsi que l'adénine et la diaminopurine sont probablement métabolisées par la même enzyme, et que le produit de cette réaction interfère avec l'interconversion des nucléotides puriniques. Bien que la diaminopurine permette d'obtenir des résultats encourageants dans les premiers essais cliniques dans les leucémies, elle induit également d'importantes toxicités gastro-intestinales composées des nausées et vomissements majeurs. La diaminopurine a par ailleurs montré

une activité *in vitro* antivirale intéressante, mais son importante toxicité oblige à abandonner son développement clinique.

➤ *Découverte des thiopurines*

Trois ans après la découverte de la diaminopurine, Gertrude Elion et George Hitchings synthétisèrent deux dérivés inhibant la biosynthèse des purines, qui changeront le cours de leur carrière et révolutionneront le traitement des leucémies : la 6-TG et la 6-MP.

Gertrude Elion et George Hitchings observèrent que les cellules leucémiques étaient hautement sensibles à la 6-MP, tandis que les cellules normales étaient plutôt résistantes. La 6-MP est alors rapidement testée chez des enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), dont le seul traitement était composé jusqu'alors de méthotrexate et de stéroïdes : elle permit d'augmenter l'espérance de vie de trois à douze mois ! Ainsi, en 1953, deux ans seulement après sa synthèse, la 6-MP a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. Cependant, le mécanisme pharmacologique de la cytotoxicité de la 6-MP était encore inconnu et il a fallu attendre quelques années de plus pour qu'il soit élucidé.

*In vitro*, l'inhibition de la croissance de *L. casei* suite à un traitement par 6-MP est levée par un ajout de bases puriques telles que l'hypoxanthine, la xanthine, l'adénine et la guanine. Des études ultérieures avec des souches de *L. casei* résistantes à la 6-MP ont révélé que ces souches étaient incapables de métaboliser l'hypoxanthine. Gertrude Elion en a conclu que l'hypoxanthine et la 6-MP étaient métabolisées par la même enzyme – qui sera identifiée plus tard comme étant l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) – et que la 6-MP inhibait l'interconversion des nucléotides puriques. La 6-TG, qui possède une activité plus puissante que la 6-MP mais aussi plus toxique a finalement trouvé sa principale application dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte.

➤ *La voie du succès*

La découverte des thiopurines ouvrit la voie à un vaste champ de recherche de molécules antimétabolites aux propriétés multiples, synthétisées par cette équipe.

Ainsi, en 1950, la pyriméthamine (Malocid®) est synthétisée. Cet antipaludéen ayant une forte affinité pour la dihydrofolate réductase, possède une activité infiniment plus toxique pour le parasite que pour l'homme, représentant ainsi un modèle de balance bénéfice/risque idéal. Puis en 1956, c'est la synthèse du triméthoprim (inclus dans Bactrim®), antibactérien utilisé en association avec les sulfamides dans les méningites, les infections urinaires ou en prophylaxie de l'infection pulmonaire à *Pneumocystis jiroveci* chez les patients immunodéprimés. Peu de temps après, un hématologue remarqua la capacité de la 6-MP à bloquer la formation d'anticorps, ce qui conduisit un chirurgien à utiliser avec succès la 6-MP pour prévenir le rejet d'un greffon rénal chez le chien. Au vu de ces résultats, Gertrude Elion synthétisa une pro-droque de la 6-MP, l'azathioprine (Imurel®), qui présentait l'avantage d'avoir un groupement imidazole greffé sur le groupement thiol afin de le protéger d'une dégradation rapide après une prise par voie orale. L'azathioprine, en association avec la prednisone, permet alors l'avènement des transplantations rénales, jusqu'à ce que l'acide mycophénolique ne vienne la détrôner dans les années 1990. L'azathioprine est aussi utilisée comme immunosuppresseur dans le traitement de diverses maladies auto-immunes. En 1963, un nouvel analogue des purines inhibant la xanthine oxydase (XO) est synthétisé : l'allopurinol (Zyloric®). Ce composé permet ainsi de bloquer la transformation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, dont l'excès entraîne la formation de cristaux dans les articulations des patients atteints de goutte. En 1968, après le départ à la retraite de George Hitchings, Gertrude Elion développe un analogue de nucléoside à guanine où le pentose est remplacé par une structure acyclique linéaire : acycloguanosine ou acyclovir (Zovirax®). L'acyclovir possède une très grande spécificité pour la thymidine kinase virale et constitue le premier médicament antiviral bloquant la réplication des virus du groupe de l'Herpès. Sa spécificité virale, environ 3000 fois plus élevée que pour l'enzyme humaine, explique que cette molécule ne présente quasiment aucune toxicité chez l'homme.

➤ *Une carrière exemplaire*

Tout au long de sa carrière, Gertrude Elion a occupé des responsabilités de plus en plus importantes jusqu'au poste de chef du département de thérapie expérimentale, poste qu'elle occupa jusqu'à son départ à la retraite en 1983. Tout juste un an après, en 1984, le laboratoire développe la 3'-azido-3'-désoxythymidine ou zidovudine (AZT, Retrovir®),

inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse et premier médicament pour le traitement du VIH, dont la mise au point s'est largement inspirée des travaux de Gertrude Elion.

Malgré trois « désavantages » majeurs qui étaient de ne pas avoir de doctorat, de ne pas avoir travaillé dans le milieu académique et d'être une femme, Gertrude Elion a su surmonter de nombreux obstacles et accéda à une carrière exemplaire remplie de succès. Elle est l'auteur de 179 publications internationales et à l'origine de 45 brevets. Ses découvertes représentent des legs majeurs pour la recherche et la thérapeutique humaine avec des molécules qui restent, à l'heure actuelle, la référence pour certaines pathologies. C'est au terme de cette carrière exceptionnelle que Gertrude Elion reçut en 1988 le Prix Nobel de Médecine et Physiologie, prix qu'elle partage avec Georges Hitchings.<sup>1</sup>



*« Le prix Nobel c'est très bien, mais les médicaments que j'ai développés sont des récompenses en eux-mêmes »*

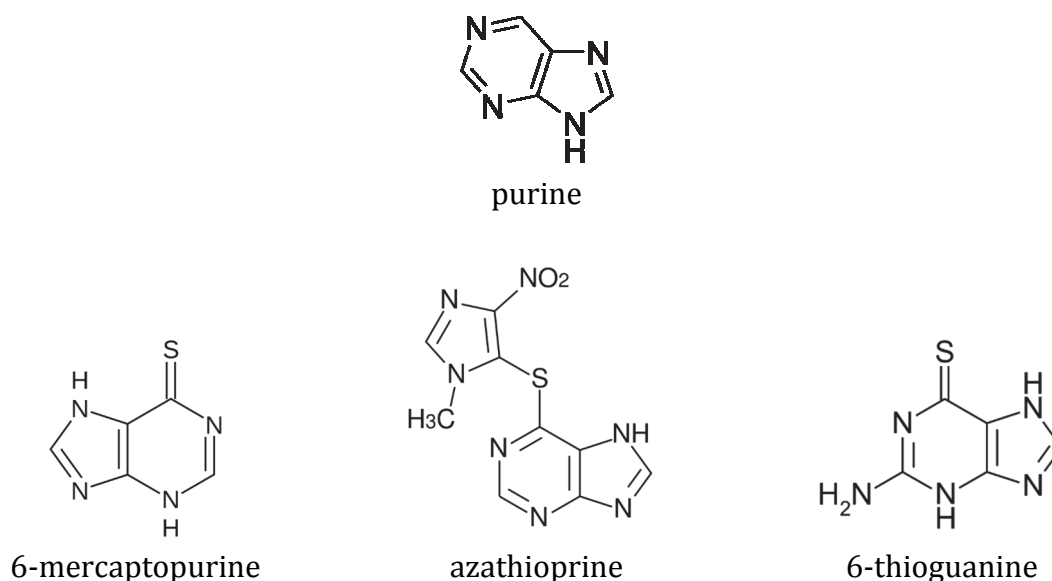
Gertrude Belle Elion

---

<sup>1</sup> Références bibliographiques : [ELION 1989, 1993; ELION *et al.* 1951; LARSEN 2009; NOBELPRIZE.ORG 2013; 2014]

## 2 Structures chimiques et propriétés pharmaceutiques

Les thiopurines possèdent une structure chimique homogène dérivée de la purine. Cette dernière est à l'origine des bases puriques – la guanine et l'adénine – constituant les nucléotides des acides nucléiques (ADN et ARN) (FIGURE 1).



**FIGURE 1. Structures chimiques de la purine et des thiopurines**

Plus précisément, les thiopurines sont des analogues puriniques possédant un groupement thiol – anciennement appelé mercaptan, du latin *mercurius captans*, « qui capte le mercure » –, c'est à dire un groupement sulfhydryle (-SH) fixé sur un carbone. Ces « thio-purines » seront métabolisées dans l'organisme en « thio-guanine » puis en « nucléotides à thio-guanine », comme décrit par la suite dans ce manuscrit.

L'azathioprine est une pro-droque de la 6-MP sur laquelle a été greffé un groupement méthylnitro-imidazole sur la fonction thiol, en vue de la protéger d'une oxydation ou d'une hydrolyse [ELION 1989].

Enfin, la 6-TG, commercialisée sous le nom de Lanvis® correspond à la base qui sera directement transformée en nucléotide à thioguanine.



## 2.1 Indications

A l'heure actuelle, en France, la 6-MP et la 6-TG sont utilisées respectivement dans les LAL et dans les leucémies aiguës myéloïdes, en phases d'entretien et de consolidation. Elles sont également prescrites à visée palliative dans les leucémies myéloïdes chroniques.

L'azathioprine est plutôt utilisée pour ses propriétés immunosuppressives dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) – la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH) – de l'adulte et de l'enfant. Ces indications en gastro-entérologie représentent environ 60 000 prescriptions par an en France. L'azathioprine est également utilisée dans le traitement de diverses maladies auto-immunes (lupus, myosites, vascularites, ...). Enfin, bien qu'elle ait permis les premières transplantations d'organes solides dans les années 1950, elle est actuellement très largement remplacée par l'acide mycophénolique dans quasiment tous les protocoles de prévention du rejet aigu, excepté dans le cadre de la transplantation pulmonaire.

## 2.2 Posologies

Dans le traitement des MICI, la posologie initiale habituelle de l'azathioprine est de 2 à 2,5 mg/kg/jour bien que l'Autorisation de mise sur le marché (AMM) préconise une posologie de 1 à 3 mg/kg/jour, sans dépasser 150 mg/jour [ANSM 2010; CHOUCHANA *et al.* 2012a]. La posologie préconisée de la 6-MP est de 50-75 mg/m<sup>2</sup>/jour dans les leucémies et de 1 à 1,5 mg/kg/jour pour son utilisation, hors AMM, dans les maladies auto-immunes [ANSM 2013; CHOUCHANA *et al.* 2012a]. Un facteur multiplicatif de 2,08 est nécessaire pour convertir des doses de 6-MP en équivalent d'azathioprine [SANDBORN 2001]. La 6-TG, utilisée généralement uniquement dans les leucémies, doit être prescrite à la posologie de 60 à 200 mg/m<sup>2</sup>/jour [ANSM 2012].

Ces médicaments sont administrés par voie orale sous forme de comprimés. Il existe cependant une forme injectable pour l'Imurel® dont l'usage est généralement restreint à des situations particulières, aiguës et de courtes durées.

## 3 Propriétés pharmacologiques

### 3.1 Pharmacocinétique

#### 3.1.1 Absorption et effet de premier passage

Après administration par voie orale, l'azathioprine et la 6-MP sont rapidement absorbées avec un pic plasmatique observé à 10 minutes pour ces deux molécules [KUROWSKI & IVEN 1991]. L'azathioprine est rapidement et massivement hydrolysée en 6-MP et en méthylnitro-imidazole par des glutathion *S*-transférases (GST), notamment GST-A1, GST-A2 et GST-M1, dont les activités sont variables en fonction du génotype [EKLUND & MANNERVIK 2007; EKLUND *et al.* 2006; KURTOVIC *et al.* 2008]. Seule une fraction inférieure à 1 % de cette réaction n'est pas catalysée par des GST et se produit spontanément en présence de glutathion [EKLUND *et al.* 2006]. De plus, environ 10 % de la dose administrée peut subir à un autre clivage chimique, produisant de l'hypoxanthine et un groupement thio-imidazole [CHALMERS 1974].

Par ailleurs, la forme 6-MP subit un effet de premier passage important avec une première métabolisation en acide thiourique au sein de la paroi du tube digestif – ainsi que dans le foie de façon moins importante – sous l'effet de la XO [BRONK *et al.* 1988; KUROWSKI & IVEN 1991]. Ainsi, les concentrations en acide thiourique retrouvées dans la muqueuse intestinale sont 16 fois plus élevées que dans la moelle osseuse, protégeant probablement l'intestin d'une accumulation toxique d'autres métabolites comme c'est le cas dans les cellules sanguines (cf. infra) [MARCHESI & SARTORELLI 1963]. Cette première métabolisation est très précoce de sorte que le pic plasmatique de ce métabolite, l'acide thiourique – ainsi que pour un autre métabolite oxydé, la 8-hydroxy-6-MP –, est observé aux alentours de 10 minutes soit quasiment au même temps que pour la molécule mère de 6-MP [KUROWSKI & IVEN 1991]. On estime qu'en moyenne 10 % (entre 3 et 25 %) de la dose administrée est retrouvée sous forme d'acide thiourique dans les urines [ANSARI *et al.* 2008c].

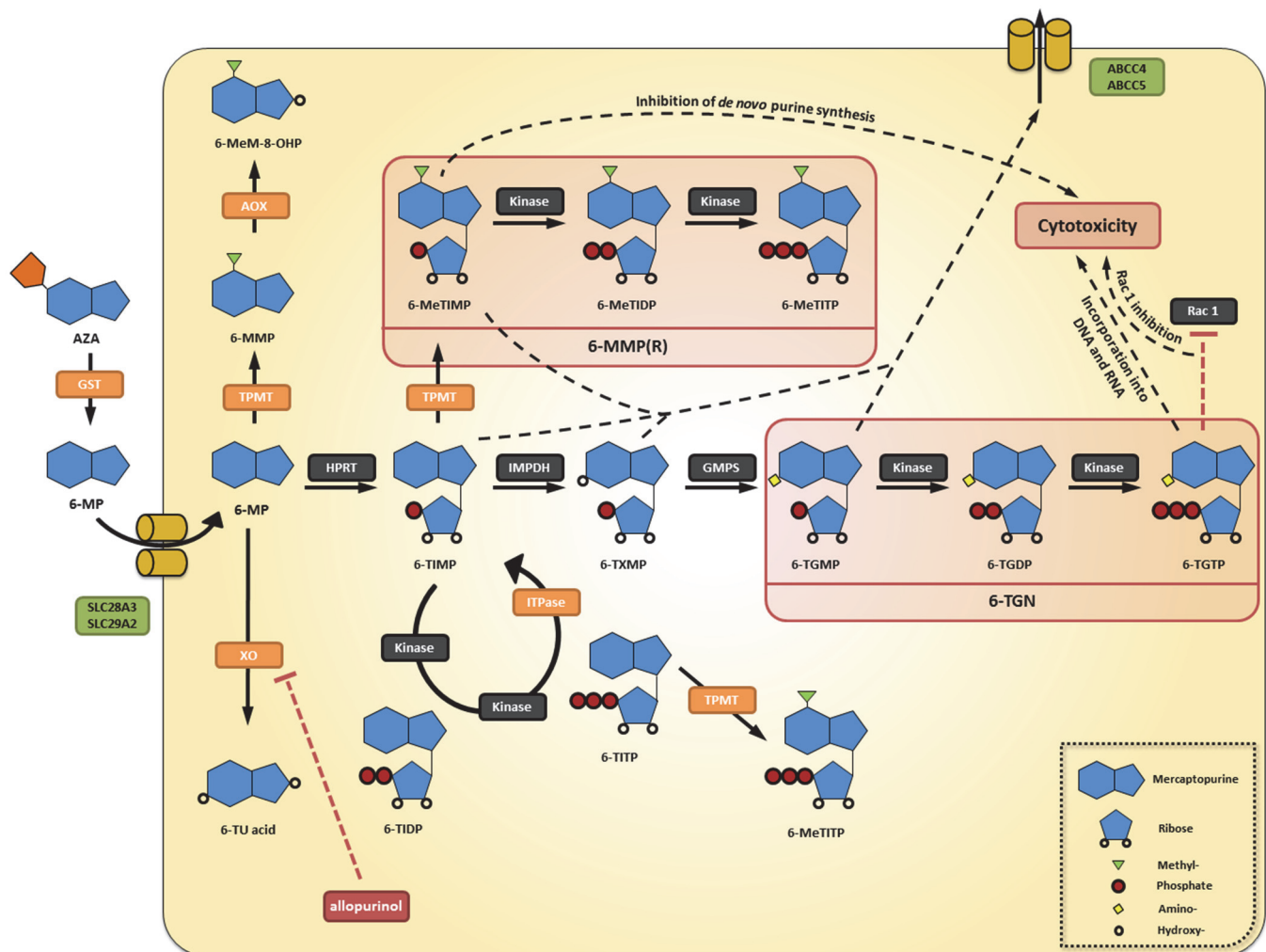
La biodisponibilité de la 6-MP est d'environ 16 % [DUBINSKY *et al.* 2000; LENNARD 1992]. Elle pourrait être réduite en cas d'administration avec du lait. En effet, des données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la présence de XO dans le lait pourrait potentialiser l'effet de premier passage et diminuer ainsi la quantité de 6-MP réellement absorbée [DE LEMOS *et al.* 2007]. Par ailleurs, les purines alimentaires, représentant environ 600-1000 mg par

jour dans un régime alimentaire occidental classique, pourraient être des inhibiteurs compétitifs de la XO au sein de la paroi intestinale et éventuellement potentialiser l'efficacité des thiopurines [ANSARI *et al.* 2008c; STOW & BRONK 1993]. Elles sont majoritairement retrouvées dans les anchois, les sardines, la cervelle, le foie ou encore les ris de veau [HUH *et al.* 1976].

Enfin, il a été montré une meilleure efficacité de la 6-MP lors d'une prise le soir plutôt que le matin, dans le cadre d'une co-administration avec du méthotrexate pour le traitement des LAL de l'enfant [SCHMIEGELOW *et al.* 1997].

### 3.1.2 Distribution

La distribution est très rapide et aucun dérivé thiopurinique, molécule mère ou métabolites, n'est retrouvé dans le compartiment plasmatique à partir de 12 heures après l'absorption orale [KUROWSKI & IVEN 1991]. La demi-vie plasmatique de la 6-MP est très courte, de l'ordre de 1 à 2 heures [ZIMM *et al.* 1983]. A l'exception du cerveau, la 6-MP se distribue dans quasiment tous les tissus de l'organisme, notamment le foie, la rate et la moelle osseuse, contenant les progéniteurs hématopoïétiques [HYSLOP & JARDINE 1981]. Après administration d'une dose unique d'azathioprine, les métabolites nucléotidiques thiopuriniques sont également retrouvés dans de nombreux tissus tels que la muqueuse intestinale, le foie, les reins, la rate, la moelle osseuse, à l'exception des globules rouges et du plasma [KUROWSKI & IVEN 1991]. La 6-MP pénètre dans les cellules par des transporteurs de nucléosides dont certains ont été identifiés : SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 et SLC29A2 – anciennement appelés respectivement CNT2, CNT3, ENT1, ENT2 [FOTOOHI *et al.* 2006; PENG *et al.* 2008; ZAZA *et al.* 2005].



Source : [CHOUCHANA et al. 2012a]

### FIGURE 2. Métabolisme des thiopurines

(i) Molécules. AZA : azathioprine ; 6-MP : 6-mercaptopurine ; 6-MMP, 6-méthylmercaptopurine ; 6-TU acid : acide 6-thiourique ; 6-MeTIMP : 6-méthylthioinosine monophosphate ; 6-MeTIDP : 6-méthylthioinosine diphosphate ; 6-MeTITP : 6-méthylthioinosine triphosphate ; 6-TIMP : 6-thioinosine monophosphate ; 6-TIDP : 6-thioinosine diphosphate ; 6-TITP : 6-thioinosine triphosphate ; 6-TXMP : 6-thioxanthosine monophosphate ; 6-TGMP : 6-thioguanosine monophosphate ; 6-TGDP : 6-thioguanosine diphosphate ; 6-TGTP : 6-thioguanosine triphosphate ; 6-MeM-8-OHP : 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine.

6-MeTIMP, 6-MeTIDP et 6-MeTITP représentent les 6-méthylmercaptapurine ribonucléotides, 6-MMP(R).

6-TGMP, 6-TGDP et 6-TGTP représentent les 6-thioguanine nucléotides, 6-TGN.

(ii) Enzymes. GST : glutathion *S*-transférase ; AOX : aldéhyde oxydase ; XO : xanthine oxydase ; TPMT : thiopurine *S*-méthyltransférase ; HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase ; IMPDH : inosine monophosphate déshydrogénase ; GMPS : guanosine monophosphate synthétase ; ITPase : inosine triphosphate pyrophosphatase.

(iii) Transporteurs. SLC28A3 et SLC29A2 : *solute carrier family*, anciennement appelés transporteurs de nucléosides ; ABCC4 and ABCC5 : *ATP binding cassette*, anciennement appelés *multidrug resistance* (MDR).

### 3.1.3 Métabolisme et élimination

Environ 12 % de la dose de 6-MP administrée est retrouvée sous forme inchangée dans les fèces [ELION 1972]. Le reste de la dose, après une première métabolisation précoce dans la paroi intestinale, est métabolisée au sein du cytoplasme intracellulaire par trois voies enzymatiques compétitives : deux voies sont cataboliques – les voies de la XO et de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) – et une est anabolique, débutant par l'HPRT. Cette enzyme, impliquée dans la synthèse des nucléotides puriques en situation physiologique, est responsable de l'initiation de la formation des métabolites actifs lors d'un traitement par thiopurine [BRONK *et al.* 1988; ELION 1967; HARTMAN & BUCHANAN 1959; KORNBERG *et al.* 1955]. Par ailleurs, les cellules sanguines ne disposent pas d'activité XO, ayant probablement pour conséquence la grande sensibilité de ces cellules aux thiopurines [LENNARD 1992; MARCHESI & SARTORELLI 1963].

Les trois voies enzymatiques sont (FIGURE 2) :

- la XO, oxydant la 6-MP en acide thiourique, métabolite inactif hydrosoluble qui sera éliminé dans les urines ; cette voie est quantitativement la plus importante ;
- la TPMT, méthylant la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) qui pourra être ensuite transformée en 6-méthylmercapto-8-hydroxypurine (6-Me-8OH-MP) par l'aldéhyde oxydase (AOX) ;
- l'HPRT, catalysant la formation du 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP), nucléotide qui aura un rôle central dans ce métabolisme et aboutira, suite à un enchaînement de réactions enzymatiques, à la formation des métabolites actifs.

Ainsi, le 6-TIMP, grâce à l'action de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) suivie par la guanosine monophosphate synthase (GMPS) formera le 6-thioguanosine monophosphate (6-TGMP), qui sera transformé par des kinases successives en 6-thioguanosine diphosphate (6-TGDP) puis triphosphate (6-TGTP). Le 6-TGMP, 6-TGDP et 6-TGTP sont regroupés sous le nom de 6-thioguanine nucléotides (6-TGN).

Par ailleurs, le 6-TIMP est également, sous l'action de la TPMT, à l'origine de la formation de dérivés méthylés, les 6-méthylmercaptopurine nucléotides (6-MMPN), regroupant des nucléotides méthylés dont le 6-méthylthioinosine monophosphate (6-MeTIMP). Enfin, le 6-TIMP est le point de départ d'un cycle futile *via* l'action de kinases successives puis de l'inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA), enzyme qui protège, en situation

physiologique, la cellule d'une accumulation de nucléotides puriques triphosphates, potentiellement mutagènes et clastogènes [LIN *et al.* 2001].

Enfin, les 6-TGN sont retrouvés à des concentrations environ 31 fois plus élevées dans les polynucléaires neutrophiles que dans les globules rouges [BERGAN *et al.* 1997].

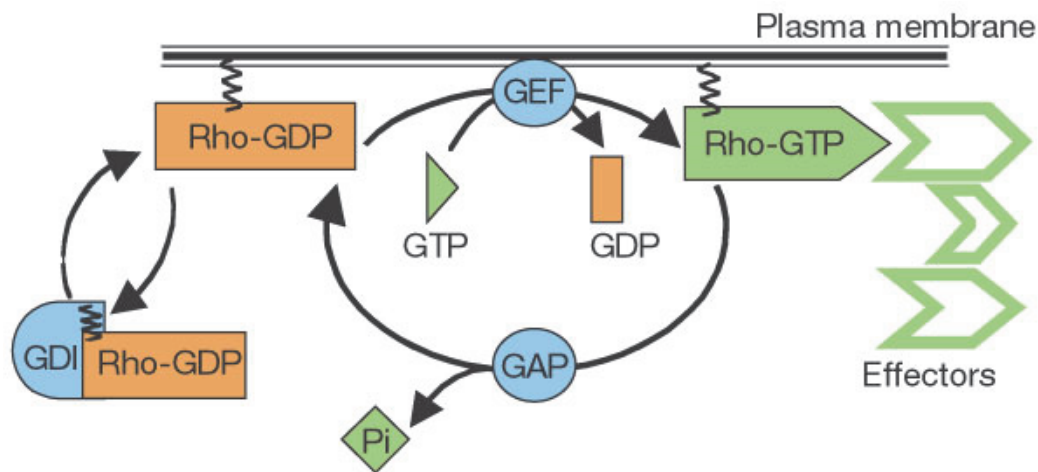
### 3.2 Pharmacodynamie

Les thiopurines sont des pro-drogues, nécessitant une bioactivation *via* le métabolisme préalablement décrit pour exercer leur activité pharmacologique. Ces médicaments ont été développés pour leur similitude structurale avec les purines et notamment la guanine. Ils ne sont actifs qu'une fois transformés en nucléotides, c'est-à-dire après ajout d'un ribose comportant un, deux ou trois groupements phosphate  $PO_4^{3-}$ .

Historiquement, le premier mécanisme d'action identifié a été l'inhibition de la phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransférase (PPAT), bloquant le passage du phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) au 5-phosphoribosylamine et entraînant une inhibition de la synthèse *de novo* des purines [TAY *et al.* 1969]. Ce mécanisme ne contribue probablement que partiellement aux propriétés anti-prolifératives des thiopurines [CARA *et al.* 2004; COULTHARD *et al.* 2002; DERVIEUX *et al.* 2001].

Le second mécanisme d'action décrit est celui d'une incorporation des 6-TGN au sein de l'ARN et de l'ADN [TIDD & PATERSON 1974]. Les 6-TGN provoquent alors des cassures simples brins et un blocage en phases G2-M du cycle cellulaire, *via* le système de réparation des mésappariements (*mismatch repair*, MMR), entraînant un arrêt de la réplication cellulaire [FAIRCHILD *et al.* 1986; YAN *et al.* 2003].

Enfin, plus récemment, un mécanisme d'action original et plus spécifique de l'effet immunosuppresseur des thiopurines a été décrit. Il implique des mécanismes d'apoptose *via* l'inhibition d'une enzyme Rho guanosine triphosphatase (RhoGTPase), Rac1, par un 6-TGN en particulier, le 6-TGTP [TIEDE *et al.* 2003] (FIGURE 3). Le 6-TGTP représente un substrat inhibiteur de Vav1, un échangeur de nucléotides à guanine (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) qui permet le passage de la forme inactive de Rac1 (liée au GDP) à sa forme active (liée au GTP) [POPPE *et al.* 2006].



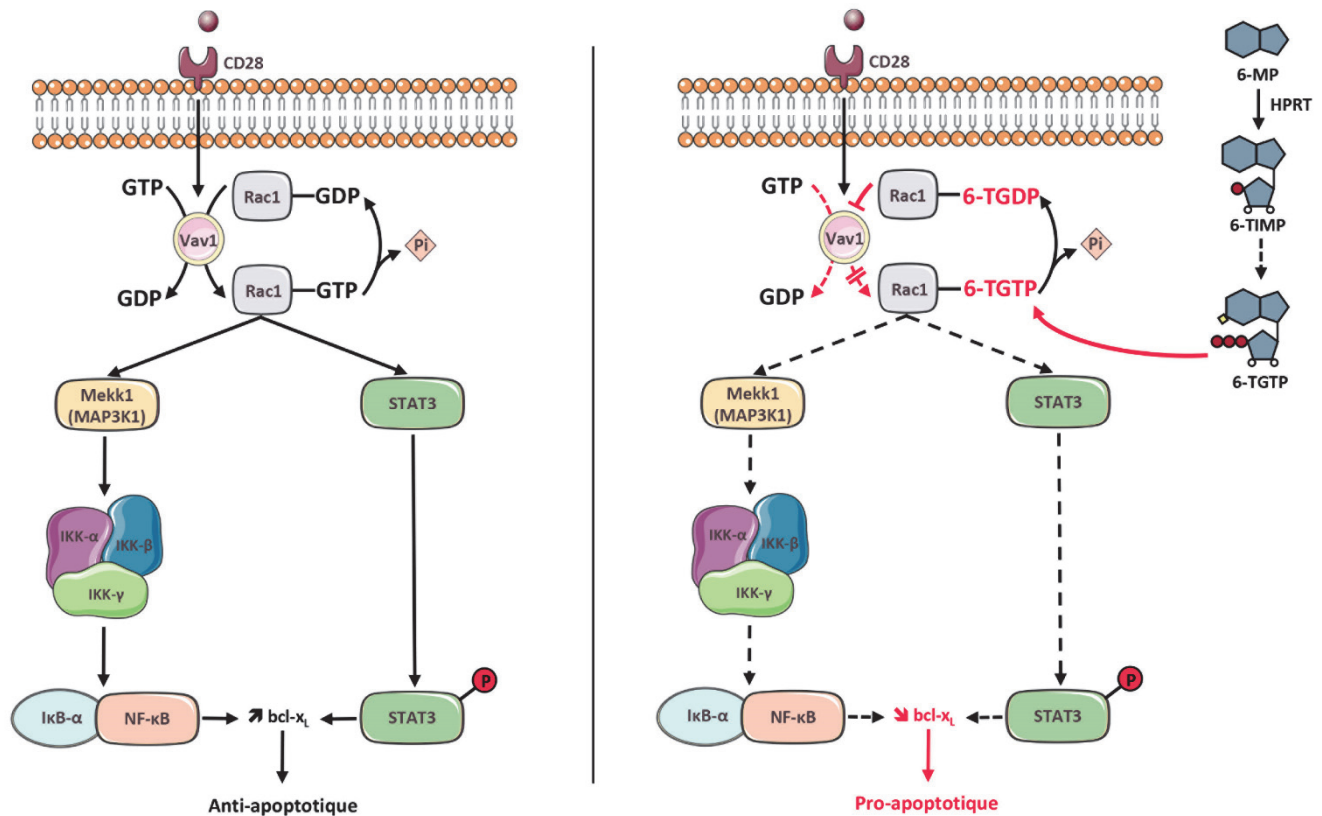
Source : [ETIENNE-MANNEVILLE & HALL 2002]

### FIGURE 3. Cycle des RhoGTPases

Les RhoGTPases alternent entre une forme active liée au GTP, et une forme inactive liée au GDP. La forme active interagit avec l'une des 60 protéines cibles identifiées (*effectors*). Le cycle est hautement régulé par trois classes de protéines : (i) des échangeurs de nucléotides à guanine (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) – tel que Vav1 – qui permettent l'activation ; (ii) des protéines activant les GTPases (*GTPase-activating proteins*, GAP) qui hydrolysent le GTP et permettent l'inactivation ; et enfin (iii) des inhibiteurs d'échange de nucléotides à guanine (*guanine nucleotide exchange inhibitors*, GDI) qui régulent les formes inactives Rho-GDP liées aux membranes en les séquestrant dans le cytoplasme.

Lors d'une réaction immunitaire, l'activation des lymphocytes T CD4+ par la présentation d'un antigène est possible uniquement en présence d'un signal de costimulation sur les récepteurs de surface CD28, permettant d'activer Rac1 [TIEDE *et al.* 2003] (FIGURE 4). Cela conduit à l'activation des voies MAP3K – impliquant IκB et NF-κB – et STAT3, renforçant les concentrations intracellulaires en bcl-xL dont l'action résulte en un signal anti-apoptotique important. Au cours d'un traitement par thiopurine, Rac1 est bloquée sous forme inactive *via* une inhibition de Vav1, ce qui empêche l'activation de ses gènes cibles tels que NF-κB et STAT3, et finalement réprime l'expression de bcl-xL, facilitant la voie intrinsèque de l'apoptose dans les lymphocytes T [TIEDE *et al.* 2003]. La potentialisation de l'apoptose des lymphocytes T activés grâce à ce mécanisme est particulièrement importante pour l'effet immunosuppresseur des thiopurines. Elle permet notamment de diminuer l'inflammation présente au sein de la *lamina propria* du tube digestif dans les MICI [THOMAS *et al.* 2005; TIEDE *et al.* 2003].





Adapté de [TIEDE et al. 2003] et de [POPPE et al. 2006]

**FIGURE 4. Mécanisme d'action moléculaire du 6-TGTP**

Cliniquement, la production et l'accumulation des 6-TGN sont nécessaires à l'obtention d'une réponse efficace. *In vivo*, l'état d'équilibre des 6-TGN est atteint en 4-5 semaines en moyenne et leur demi-vie est comprise entre 3 et 13 jours, avec une grande variabilité inter-individuelle [CHAN et al. 1990; GILISSEN et al. 2004; HINDORF et al. 2006a; POZLER et al. 2010]. Ainsi pour la plupart des patients, l'efficacité clinique apparaît entre 12 et 17 semaines après le début du traitement [CHANDE et al. 2013].



### 3.3 Pharmacogénétique

Le métabolisme complexe des thiopurines, permettant la production des dérivés actifs (6-TGN et 6-MMPN) présente une variabilité inter-individuelle importante se traduisant par une réponse clinique hétérogène. La variabilité observée au sein de ce métabolisme est principalement sous la dépendance de la TPMT.

La TPMT représente probablement l'un des exemples les plus illustratifs et les mieux étudiés à ce jour dans le domaine de la pharmacogénétique. Elle constitue également l'une des plus belles réussites d'application hospitalière de la pharmacogénétique.

#### 3.3.1 Définitions

La pharmacogénétique est « l'étude de l'influence des variations de la séquence en ADN sur la réponse aux médicaments » selon l'*European medicines agency* (EMA, Agence européenne des médicaments). De manière plus globale, la pharmacogénomique étudie les relations entre des variations génétiques (ADN, ARN) et la réponse aux médicaments selon l'*American medical association* [AMA]. Ces deux termes sont souvent utilisés indistinctement [WEINSHILBOUM & WANG 2004].

La connaissance de l'influence de variations génétiques sur la réponse aux médicaments offre la possibilité de dépister, avant le début d'un traitement, les patients à risque de développer une toxicité ou de ne pas répondre de manière efficace malgré les doses conventionnelles d'un médicament donné. Ainsi, la pharmacogénétique a pour but ultime le développement de tests génétiques visant à identifier des individus à risque de réponse « anormale » aux médicaments, aussi bien en termes d'efficacité que de toxicités, permettant ainsi une optimisation thérapeutique.

#### 3.3.2 Historique

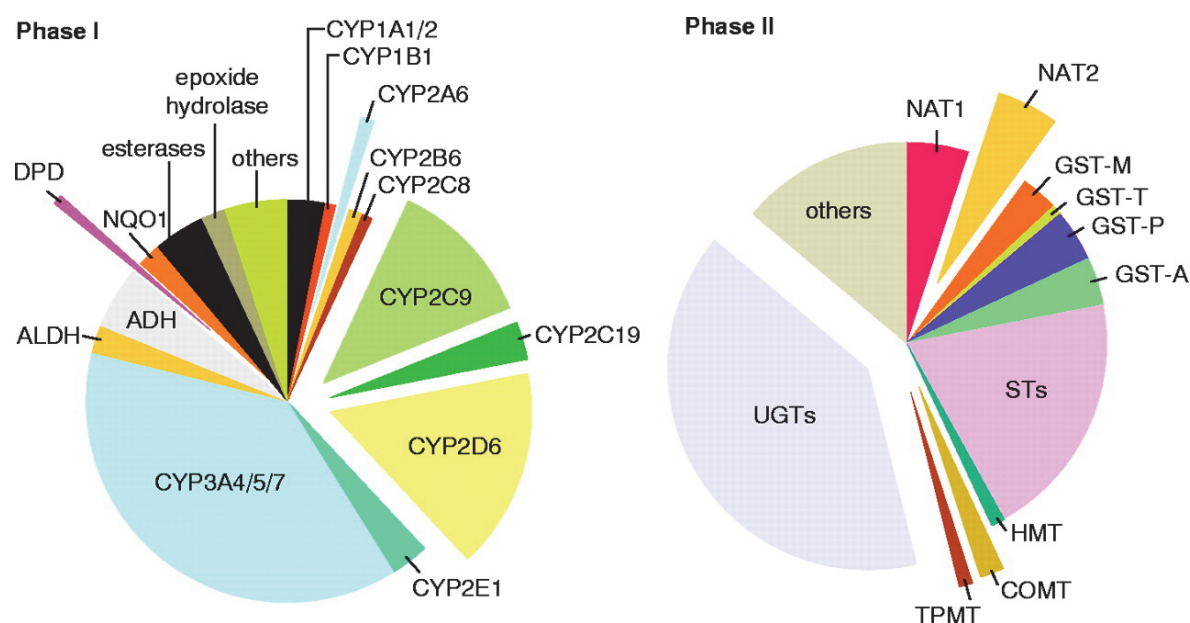
Dès le VI<sup>ème</sup> siècle avant notre ère, le philosophe et mathématicien grec Pythagore déconseillait à ses disciples de consommer des fèves (*Vicia faba*). Il avait remarqué que l'ingestion de fèves entraînait, chez certains individus, l'apparition d'un ictère et d'une asthénie [CAPPELLINI & FIORELLI 2008]. Il faudra attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour que

des médecins italiens établissent une description clinique de ce symptôme, appelé favisme. Par la suite, en 1956, Carson et ses collègues ont découvert que des individus développant une anémie hémolytique suite à un traitement par primaquine, un anti-paludéen, avaient une activité enzymatique en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) fortement diminuée [CARSON *et al.* 1956]. La même année, il a été rapporté en Sardaigne que les symptômes apparus suite à l'ingestion de fèves étaient similaires à ceux observés après un traitement par primaquine, et avaient probablement la même origine biochimique [CROSBY 1956]. Enfin, grâce aux premières hypothèses de l'origine génétique de certains déficits enzymatiques héréditaires émises dès 1902 par Sir Archibald E. Garrod, médecin diplômé de l'Université d'Oxford, nous savons aujourd'hui que le déficit en activité G6PD est due à la présence de mutations sur le gène *G6PD* [GARROD 1902; CAPPELLINI & FIORELLI 2008]. Ce déficit, entraîne, après l'ingestion de xénobiotiques tels que certains aliments ou médicaments, l'apparition d'une anémie hémolytique et d'un ictère. Ainsi, il y a 2500 ans, Pythagore venait probablement de faire sans le savoir les premières observations pharmacogénétiques de l'histoire.

Dans les années 1950, alors que le lien entre G6PD et anémie hémolytique suite à un traitement par primaquine commençait à apparaître, diverses observations cliniques ont rapporté des effets indésirables en lien avec des caractères héréditaires. Ainsi, en 1954 Hughes *et al.* décrivirent des cas d'apnée prolongée dus au suxaméthonium associée à un déficit en cholinestérase [HUGHES *et al.* 1954]. Puis, en 1956, Werner Kalow rapporta des cas de neuropathie périphérique chez des patients traités par isoniazide et présentant un défaut d'acétylation [KALOW 1956]. Ces observations cliniques successives conduisirent à la démonstration du caractère héréditaire, selon un mode mendélien, de réponses anormales à certains traitements médicamenteux et, en 1959, le terme de « pharmacogénétique » était proposé [VOGEL 1959]. Ces effets indésirables étaient associés à des concentrations circulantes très élevées des médicaments incriminés. Ainsi, en constatant une élimination extrêmement lente de médicaments par certains patients, l'implication des enzymes du métabolisme des médicaments, et notamment les cytochromes P450 (CYP), a été étudiée dans le cadre de la pharmacocinétique [EVANS & RELLING 1999; RELLING & DERVIEUX 2001]. Les premiers polymorphismes d'activité ont été identifiés avec le CYP2D6 et son substrat médicamenteux, la débrisoquine – un antihypertenseur – à la fin des années 1970 par l'équipe de Robert L. Smith en Angleterre puis par celle de Michel Eichelbaum en Allemagne [MAHGOUB *et al.* 1977; SPANNBRUCKER *et*

*al.* 1978]. Les individus dont le phénotype était « métaboliseur lent », présentaient un rapport [métabolite/molécule mère] faible et étaient à risque élevé de syncope suite à un traitement par débrisoquine [MAHGOUB *et al.* 1977]. Pour l'anecdote, Robert L. Smith lui-même, s'étant inclus dans sa propre recherche comme c'était l'habitude à cette époque, a fait une syncope suite à la prise de débrisoquine, signant ainsi la présence d'un phénotype « métaboliseur lent » du CYP2D6. L'hypothèse d'une anomalie génétique à transmission mendélienne a été retenue en caractérisant le phénotype d'individus et de leur famille. Pour la première fois en 1988, les progrès de la biologie moléculaire permettront le clonage du *CYP2D6* et l'identification d'un polymorphisme génétique entraînant une baisse de l'expression de l'enzyme CYP2D6 et définissant des sous-groupes d'individus en fonction de leur capacité métabolique. Ces travaux étaient précurseurs de la pharmacogénétique moderne [GONZALEZ *et al.* 1988]. L'introduction des tests pharmacogénétiques à l'hôpital au début des années 2000 puis le séquençage du génome en 2003 permettront un nouvel essor dans le développement de cette discipline.

Actuellement, de nombreux polymorphismes d'activité ont été identifiés sur (i) des enzymes du métabolisme des médicaments de phase I (CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19) ou de phase II (UGT1A1, TPMT, GST), (ii) des transporteurs de médicaments (ABCB1, ABCC4) ou (iii) des cibles thérapeutiques (VKORC1), en lien avec une variabilité inter-individuelle de réponse à différents médicaments (FIGURE 5).



Source : [EVANS & RELLING 1999]

**FIGURE 5. Enzymes du métabolisme des médicaments en fonction de leur importance relative**

A gauche, les enzymes dites de Phase I, responsables de modifications de groupements fonctionnels ; à droite, les enzymes dites de Phase II, responsables de la conjugaison avec des substrats endogènes ayant pour but de rendre les métabolites plus hydrophiles. La plupart de ces enzymes présentent des polymorphismes génétiques, ceux pour lesquels des conséquences cliniques sur la réponse aux médicaments ont déjà été rapportées sont séparés du graphique circulaire.

ADH, alcool déshydrogénase ; ALDH, aldéhyde déshydrogénase ; CYP, cytochrome P450 ; DPD, dihydropyrimidine déshydrogénase ; NQO1, NADPH quinone oxidoreductase ; COMT, catéchol O-méthyltransférase ; GST, glutathion S-transférase ; HMT, histamine méthyltransférase ; NAT, N-acétyltransférase ; STs, sulfotransférases ; TPMT, thiopurine S-méthyltransférase ; UGTs, uridine 59-triphosphate glucuronosyltransférases.

### 3.3.3 Applications cliniques

La FDA aux Etats-Unis a été la première agence d'enregistrement des médicaments à intégrer dès 2003 des recommandations pharmacogénétiques dans les Résumés des caractéristiques du produit (RCP) de certains médicaments, afin de prévenir des effets indésirables graves (Annexe 1). Les tests pharmacogénétiques actuellement disponibles permettent majoritairement de prévenir la survenue d'effets indésirables majeurs, à savoir des surdosages graves chez les patients porteurs à l'état hétérozygote ou homozygote d'un ou plusieurs variants alléliques [BECQUEMONT *et al.* 2010]. Cependant, les facteurs génétiques (impliquant un gène unique ou plusieurs gènes) ne permettent pas à eux seuls d'expliquer la totalité de la variabilité de la réponse aux médicaments, même

s'ils peuvent dans certains cas représenter une part importante dans cette variabilité. Généralement, d'autres causes non génétiques (surdosage, interactions médicamenteuses, comorbidités, alimentation, tabac, alcool...) peuvent également être à l'origine de l'apparition d'effets indésirables. Il est ainsi possible de classer les tests pharmacogénétiques en deux catégories selon leur valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN).

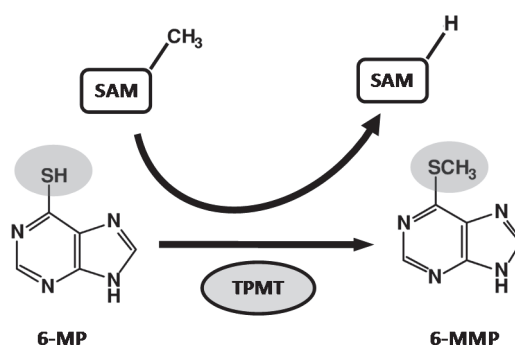
(i) Les tests ayant une VPP proche de 100 % et une VPN médiocre (< 80 %) : dans ce cas, en présence d'une anomalie génétique, l'effet indésirable attendu se produira ; cependant, en cas d'absence de l'anomalie, l'effet indésirable pourra également survenir.

(ii) Les tests dont la VPP et la VPN sont médiocres (< 80 %) : ces tests permettent d'évaluer un risque global de survenue d'un effet indésirable, tout en étant peu informatifs à l'échelle de l'individu.

#### 3.3.4 Thiopurine S-méthyltransférase (TPMT)

##### ➤ *Généralités*

La publication originelle de Weinshilboum et Sladek établissant l'importante variabilité inter-individuelle de l'activité TPMT, dont l'hypothèse était une origine génétique héréditaire, date de 1980 [WEINSHILBOUM & SLADEK 1980]. Trois ans plus tard, en 1983, la TPMT était purifiée et caractérisée, puis en 1996, le gène codant pour la TPMT était cloné et un premier polymorphisme génétique identifié [SZUMLANSKI *et al.* 1996; WOODSON & WEINSHILBOUM 1983]. Ces travaux ont été initiateurs d'un très vaste champ de recherches en pharmacogénétique sur l'implication de la TPMT dans la réponse clinique aux thiopurines. Ainsi, avec plus de 600 publications internationales en 2014 sur la TPMT et les thiopurines, cela constitue un des exemples princeps de la pharmacogénétique et probablement le mieux caractérisé.



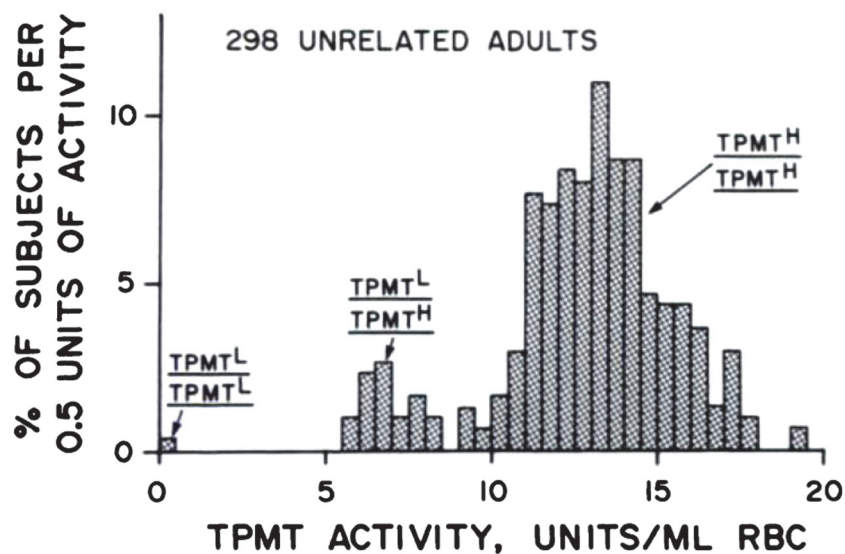
**FIGURE 6. Réaction de méthylation catalysée par la TPMT**

La TPMT est une enzyme cytosolique qui catalyse la méthylation des cycles aromatiques, plus particulièrement des thiopurines, en utilisant la *S*-adénosyl *L*-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle (FIGURE 6). La SAM est le cofacteur indispensable de la TPMT et un déficit en SAM pourrait altérer l'activité TPMT [DEININGER *et al.* 1994; REMY 1963]. A ce jour, aucun substrat endogène de la TPMT n'est identifié. Cependant, la TPMT est une enzyme extrêmement conservée au travers de l'évolution et retrouvée dans de nombreux mammifères, oiseaux, amphibiens et bactéries [REMY 1963]. Des études par homologie de séquences suggèrent que la TPMT pourrait avoir un rôle dans la méthylation des composés organiques ou inorganiques contenant du soufre, du sélénium ou du tellurium, afin de les détoxifier [HASSOUN *et al.* 1995; KRYNETSKI & EVANS 2003].

La TPMT est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus et des corrélations ont été effectuées entre les activités retrouvées dans les globules rouges, les lymphocytes, le foie et le rein [COULTHARD *et al.* 1998; VAN LOON & WEINSHILBOUM 1982; VAN LOON *et al.* 1992; MCLEOD *et al.* 1995b; OVERALL *et al.* 2009; SZUMLANSKI *et al.* 1992].

➤ *Activité (phénotype) TPMT*

Historiquement, Weinshilboum et Sladek, dans une étude portant sur 298 individus aléatoirement sélectionnés, ont montré que l'activité TPMT présente une distribution d'activité trimodale : environ 89 % des individus ont une activité élevée (phénotype rapide), 11 % ont une activité intermédiaire (phénotype intermédiaire) et 1 individu sur 298 (0,3 %) a une activité indétectable ou basse (phénotype lent) [WEINSHILBOUM & SLADEK 1980] (FIGURE 7). Les auteurs, en se basant sur des études familiales font l'hypothèse que cette activité polymorphe, dont la distribution est trimodale, est en lien avec une transmission génétique autosomale codominante. Ainsi, les individus ayant une activité indétectable, intermédiaire ou élevée sont, respectivement, porteurs de deux, d'un ou d'aucun variants alléliques pour le gène *TPMT*.



Source : [WOODSON et al. 1982]

**FIGURE 7. Distribution trimodale de l'activité TPMT**

Fréquence de distribution de l'activité TPMT dans les globules rouges à partir de prélèvement sanguins de 298 individus adultes sans lien de parenté entre eux. Les trois sous-groupes de valeurs pour les individus avec les différents génotypes estimés pour le locus *TPMT* sont indiqués au-dessus de l'histogramme : TPMT low/low, TPMT low/high, TPMT high/high. Modifié à partir de [WEINSHILBOUM & SLADEK 1980].

Vingt-quatre ans plus tard, l'analyse d'une corrélation génotype-phénotype de la TPMT à partir d'une étude allemande incluant des individus sains d'origine caucasienne a retrouvé un taux similaire de 0,6 % de patients homozygotes mutés [SCHAEFFELER *et al.* 2004]. Par la suite, une étude espagnole sur 14 545 patients atteints d'une maladie auto-immune a également établi une fréquence de 0,5 % de patients ayant une activité totalement déficitaire [GISBERT *et al.* 2007a]. Ainsi, deux études incluant des effectifs très élevés ont confirmé cette répartition sur la base du génotype. Cependant, sur la base de la distribution de l'activité, des chevauchements entre les sous-groupes (phénotypes) existent et rendent parfois délicate l'interprétation du phénotype. En effet, même si sa distribution est historiquement décrite comme trimodale, l'activité TPMT semble plutôt variable au sein de larges intervalles de valeurs. De plus, environ 15% des patients ont une activité TPMT très élevée, c'est-à-dire au-dessus des valeurs normales habituelles [ANSARI *et al.* 2002a].

Parmi les paramètres physiologiques, l'âge ou le sexe ne semblent pas modifier de manière significative l'activité TPMT, même si plusieurs études ont rapporté une activité légèrement plus faible chez les enfants et les femmes [COOPER *et al.* 2008b; GANIERE-MONTEIL *et al.* 2004; GISBERT *et al.* 2007a]. En outre, plusieurs études chez les caucasiens ont montré une distribution similaire de l'activité TPMT chez les individus sains et chez les patients ayant une MICI [COROMINAS *et al.* 2000; REUTHER *et al.* 2003b].



Allèle	Modification de nucléotide sur le gène <i>TPMT</i> (séquence NCBI NM_000367.2), décrite sur le brin négatif du chromosome	Reference SNP cluster ID (rs ID) et SNP (sur le brin positif du chromosome)	Localisation sur le gène	Modification d'acide aminé (séquence NCBI NP_000358.1)	Références
<i>TPMT*1</i>	Allèle sauvage <sup>1</sup>				
<i>TPMT*1A</i>	-178C>T	N/A, G>A	Exon 1		[SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE <i>et al.</i> 1998b]
<i>TPMT*1S</i>	474T>C <sup>1</sup>	rs2842934, A>G <sup>1</sup>	Exon 7	Ile158Ile	[YATES <i>et al.</i> 1997]
<i>TPMT*2</i>	238G>C	rs1800462, C>G	Exon 5	Ala80Pro	[KRYNETSKI <i>et al.</i> 1995; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; TAI <i>et al.</i> 1996, 1997; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*3A</i>	460G>A 719A>G	rs1800460, C>T rs1142345, T>C	Exon 7 Exon 10	Ala154Thr Tyr240Cys	[SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SZUMLANSKI <i>et al.</i> 1996; TAI <i>et al.</i> 1996, 1997; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*3B</i>	460G>A	rs1800460, C>T	Exon 7	Ala154Thr	[SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SZUMLANSKI <i>et al.</i> 1996; TAI <i>et al.</i> 1996; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*3C</i>	719A>G	rs1142345, T>C	Exon 10	Tyr240Cys	[SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SZUMLANSKI <i>et al.</i> 1996; TAI <i>et al.</i> 1996; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*3D</i>	292G>T 460G>A 719A>G	rs72552739, C>A rs1800460, C>T rs1142345, T>C	Exon 5 Exon 7 Exon 10	Glu98Stop Ala154Thr Tyr240Cys	[OTTERNESS <i>et al.</i> 1997]
<i>TPMT*3E</i>	140 +114T>A 141 -101A>T 366+58T>C 460G>A 474T>C 719A>G	rs3931660, A>T rs12529220, T>A rs2518463, A>G rs1800460, C>T rs2842934, A>G rs1142345, T>C	Intron 3 Intron 3 Intron 4 Exon 7 Exon 7 Exon 10	Ala154Thr Ile158Ile Tyr240Cys	[COLLEONI <i>et al.</i> 2013]
<i>TPMT*4</i>	626-1G>A	rs1800584, C>T	Intron 9/exon 10 (jonction d'épissage)		[OTTERNESS <i>et al.</i> 1997]
<i>TPMT*5</i>	146T>C	rs72552740, A>G	Exon 4	Leu49Ser	[OTTERNESS <i>et al.</i> 1997; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*6</i>	539A>T	rs75543815, T>A	Exon 8	Tyr180Phe	[OTTERNESS <i>et al.</i> 1997; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*7</i>	681T>G	rs72552736, A>C	Exon 10	His227Gln	[OTTERNESS <i>et al.</i> 1997; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE <i>et al.</i> 1998b; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*8</i>	644G>A	rs56161402, C>T	Exon 10	Arg215His	[HON <i>et al.</i> 1999; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*9</i>	356A>C	rs151149760, T>G	Exon 5	Lys119Thr	[SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2004; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*10</i>	430G>C	rs72552737, C>G	Exon 7	Gly144Arg	[COLOMBEL <i>et al.</i> 2000; HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> 2003; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
<i>TPMT*11</i>	395G>A	rs72552738, C>T	Exon 6	Cys132Tyr	[SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2003; UJIE <i>et al.</i> 2008]

(suite TABLEAU 1 page suivante)

(TABLEAU 1 suite)

TPMT*12	374C>T	N/A, G>A	Exon 6	Ser125Leu	[HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> 2003; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*13	83A>T	rs72552742, T>A	Exon 3	Glu28Val	[HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> 2003; SALAVAGGIONE <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*14 <sup>¶</sup>	1A>G	rs9333569, T>C	Exon 3	Met1Val	[LINDQVIST <i>et al.</i> 2004; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*15	495-1G>A	rs9333570, C>T	Intron 7/exon 8 (jonction d'épissage)		[LINDQVIST <i>et al.</i> 2004]
TPMT*16	488G>A	rs144041067, C>T	Exon 7	Arg163His	[HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> 2005; SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2004; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*17	124C>G	N/A, G>C	Exon 3	Gln42Glu	[SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2004; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*18	211G>A	N/A, C>T	Exon 4	Gly71Arg	[SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2004; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*19 <sup>¶</sup>	365A>C	N/A, T>G	Exon 5	Lys122Thr	[HAMDAN-KHALIL <i>et al.</i> 2005; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*20 <sup>¶</sup>	712A>G	rs150900439, T>C	Exon 10	Lys238Glu	[SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2006; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*21 <sup>¶</sup>	205C>G	rs200591577, G>C	Exon 4	Leu69Val	[SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2006; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*22 <sup>¶</sup>	488G>C	N/A, C>G	Exon 7	Arg163Pro	[SCHAEFFELER <i>et al.</i> 2006; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*23 <sup>¶</sup>	500C>G	rs74423290, G>C	Exon 8	Ala167Gly	[LINDQVIST <i>et al.</i> 2007]
TPMT*24 <sup>¶</sup>	537G>T	rs6921269, C>A	Exon 8	Gln179His	[GARAT <i>et al.</i> 2008]
TPMT*25 <sup>¶</sup>	634T>C	N/A, A>G	Exon 10	Cys212Arg	[GARAT <i>et al.</i> 2008]
TPMT*26 <sup>¶</sup>	622T>C	rs72556347, A>G	Exon 9	Phe208Leu	[KHAM <i>et al.</i> 2009]
TPMT*27 <sup>¶</sup>	319T>G	N/A, A>C	Exon 5	Tyr107Asp	[FENG <i>et al.</i> 2010]
TPMT*28 <sup>¶</sup>	349G>C <sup>2</sup>	N/A, C>G	Exon 5	Gly117Arg	[LANDY <i>et al.</i> 2011]
TPMT*29 <sup>¶</sup>	2T>C	rs267607275, A>G	Exon 3	Met1Thr	[LEE <i>et al.</i> 2012a]
TPMT*30 <sup>¶</sup>	106G>A	N/A, C>T	Exon 3	Gly36Ser	[SASAKI <i>et al.</i> 2006; UJIE <i>et al.</i> 2008]
TPMT*31 <sup>¶</sup>	611T>C <sup>3</sup>	rs79901429, A>G <sup>3</sup>	Exon 9	Ile204Thr	[APPELL <i>et al.</i> 2010]
TPMT*32	340G>A	rs115106679, C>T	Exon 5	Glu114Lys	[LENNARD <i>et al.</i> 2013]
TPMT*33	487C>T	rs112339338, G>A	Exon 7	Arg163Cys	[LENNARD <i>et al.</i> 2013]
TPMT*34	244C>T	rs111901354, G>A	Exon 5	Arg82Trp	[LENNARD <i>et al.</i> 2013]
TPMT*35	200T>C <sup>4</sup>	N/A, A>G	Exon 3	Phe67Ser	[SKRZYPCZAK-ZIELINSKA <i>et al.</i> 2013]
TPMT*36	595G>A <sup>4</sup>	N/A, C>T	Exon 8	Val199Ile	[SKRZYPCZAK-ZIELINSKA <i>et al.</i> 2013]
TPMT*37	648T>A	rs398122996, A>T	Exon 10	Cys216Ter	[ROBERTS <i>et al.</i> 2014a]

Source : adapté de [www.imh.liu.se/tpmtalleles/tabell-over-tpmt-alleler?!=en](http://www.imh.liu.se/tpmtalleles/tabell-over-tpmt-alleler?!=en)
**TABLEAU 1. Nomenclature des allèles TPMT et description des polymorphismes génétiques connus**

N/A : non référencé sur dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)).

<sup>1</sup> La base de données dbSNP rapporte une substitution c.474C>T : le comité de la nomenclature TPMT a défini l'allèle sauvage \*1 par un nucléotide T (brin négatif) à cette position et le variant \*1S par un nucléotide C (brin négatif) ; <sup>2</sup> Substitution de nucléotide incorrecte dans la publication originale ; <sup>3</sup> Anciennement TPMT\*28 ;

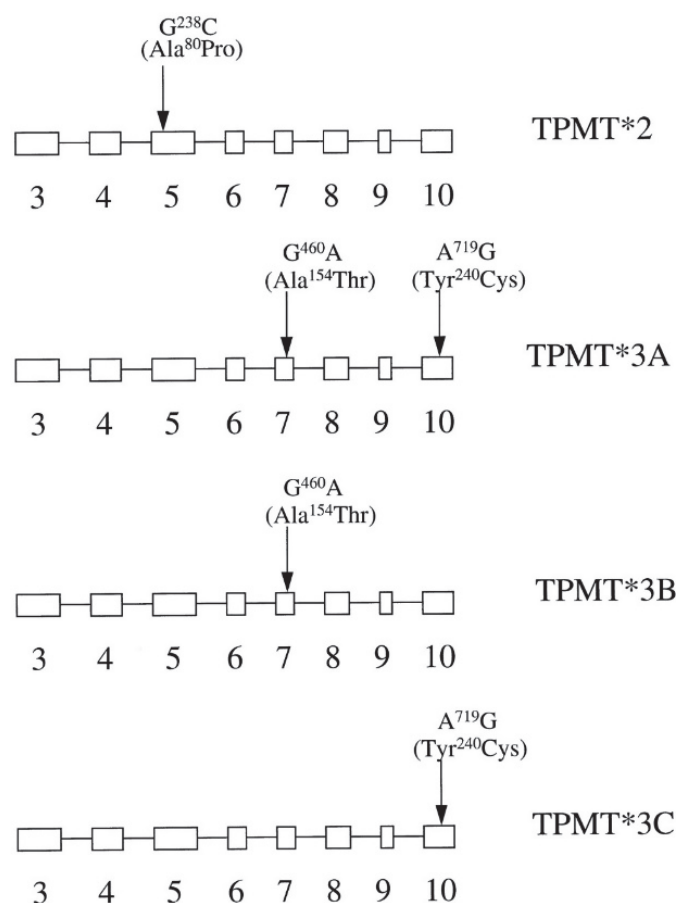
<sup>4</sup> Allèles numérotés différemment dans la publication originale. <sup>¶</sup> Allèles (\*7, \*14, \*15, \*19, \*20, \*21, \*22, \*23, \*24, \*25, \*26, \*27, \*28, \*29, \*30, \*31) aux conséquences fonctionnelles actuellement mal connues.

➤ *Polymorphisme génétique de la TPMT*

La variabilité enzymatique inter-individuelle de l'activité TPMT est en lien avec la présence de polymorphismes génétiques (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sur le gène *TPMT* [OTTERNESS *et al.* 1997; SZUMLANSKI *et al.* 1996]. Le gène *TPMT*, localisé sur le bras court du chromosome 6 (6p22.3), est composé de 10 exons et 9 introns, et a une longueur de 34 000 paires de bases (34 kb) [SZUMLANSKI *et al.* 1996]. A ce jour, 40 variants alléliques (*TPMT*\*2 - *TPMT*\*37) ont été identifiés et caractérisés par comparaison à l'allèle sauvage *TPMT*\*1 [APPELL *et al.* 2010, 2013; GARAT *et al.* 2008; KHAM *et al.* 2009; UJIE *et al.* 2008] (TABLEAU 1). A l'exception des variants alléliques *TPMT*\*4 et *TPMT*\*15 impliquant des sites introniques d'épissage alternatif résultant en une baisse de l'expression enzymatique [LINDQVIST *et al.* 2004; OTTERNESS *et al.* 1998; WANG *et al.* 2010], l'ensemble des variants alléliques sont caractérisés par des mutations faux-sens [APPELL *et al.* 2013; UJIE *et al.* 2008]. La conséquence fonctionnelle de certains variants alléliques sur l'activité TPMT n'est pas connue (TABLEAU 1).

Chez les caucasiens, l'allèle *TPMT*\*3A est le variant allélique le plus couramment retrouvé avec une fréquence de 3,6 % [RELLING *et al.* 2013]. Il résulte de l'association de deux SNP, c.460G>A (rs1800460, p.Ala154Thr) et c.719A>G (rs1142345, p.Tyr240Cys), respectivement, sur les exons 7 et 10 du gène *TPMT* [YATES *et al.* 1997]. Ces mêmes SNP retrouvés seuls sur les exons 7 et 10 caractérisent, respectivement, les allèles *TPMT*\*3B et *TPMT*\*3C qui sont beaucoup moins fréquents, tout comme le SNP c.238G>C (rs1800462, p.Ala80Pro) sur l'exon 5 qui correspond à l'allèle *TPMT*\*2. Ces trois allèles *TPMT*\*3B, *TPMT*\*3C et *TPMT*\*2 sont retrouvés chez les caucasiens avec une fréquence respective de 0,046 %, 0,42 % et 0,19 % [RELLING *et al.* 2013]. Au total, les 4 principaux variants alléliques (*TPMT*\*2, *TPMT*\*3A, *TPMT*\*3B et *TPMT*\*3C) représentent environ 90-95 % des individus caucasiens ayant un déficit d'activité TPMT, dont la prévalence est estimée environ de 1/178 à 1/3736 [LOENNECHEN *et al.* 2001; RELLING *et al.* 2011a; ROBERTS *et al.* 2014a; SCHAEFFELER *et al.* 2008; YATES *et al.* 1997] (FIGURE 8). La présence de ces 3 SNP a pour conséquence une demi-vie réduite et une diminution de la quantité de la protéine dans les cellules, due à une dégradation accrue par le protéasome [TAI *et al.* 1997; WANG *et al.* 2003]. Au final, il en résulte une baisse de l'activité TPMT [SZUMLANSKI *et al.* 1996].

En revanche, il existe d'importantes différences inter-ethniques de distribution des génotypes en fonction des populations. Ainsi, alors que l'allèle *TPMT\*3C* est peu représenté chez les caucasiens, il représente le variant allélique le plus fréquent chez les asiatiques, notamment en Chine et en Asie du Sud-Est avec une fréquence de l'ordre de 1,6 % et chez les africains avec une fréquence de l'ordre de 5 % [COLLIE-DUGUID *et al.* 1999; RELLING *et al.* 2011a; SCHAEFFELER *et al.* 2008]. Par ailleurs, l'allèle *TPMT\*6* constitue un variant allélique communément retrouvé en Asie du Sud-Est [LEE *et al.* 2008; SCHAEFFELER *et al.* 2008]. On note également une fréquence élevée de l'allèle *TPMT\*8* chez les africains, avec une prévalence de 38 % parmi l'ensemble des allèles non-fonctionnels au sein de certaines populations d'Afrique Sub-Saharienne [OLIVEIRA *et al.* 2007].



Source : [COULTHARD *et al.* 1998]

**FIGURE 8. Variants alléliques du gène *TPMT* les plus fréquents chez les caucasiens**

➤ *Corrélation génotype-phénotype*

Il existe globalement une bonne corrélation génotype-phénotype pour la TPMT : les individus hétérozygotes présentent un déficit partiel d'activité, alors que les individus homozygotes mutés porteurs de deux variants alléliques présentent un déficit complet d'activité TPMT [KRYNETSKI & EVANS 2000; OTTERNESS *et al.* 1997]. Une récente méta-analyse de la littérature a montré que la sensibilité du génotypage pour l'identification du déficit (total et partiel) de l'activité TPMT était comprise entre 70,3 % et 86,5 % [BOOTH *et al.* 2011]. Cependant, des concordances génotype-phénotype différentes ont été décrites, en lien avec une distribution différente des variants alléliques, selon les groupes ethniques étudiés. Ainsi, la prévalence d'au moins un variant allélique est de l'ordre de 10 % chez les caucasiens alors qu'elle n'est que de 2 % en Asie du Sud-Est et de 5 % en Chine [COLLIE-DUGUID *et al.* 1999].

Les SNP précédemment décrits affectant les séquences codantes du gène *TPMT* ne sont pas suffisants pour expliquer la grande variabilité enzymatique observée dans la population générale. Des discordances entre le génotype et le phénotype TPMT ont été rapportées dans de nombreuses études [LINDQVIST *et al.* 2007; SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE *et al.* 1998a]. Le génotype est pour la plupart du temps défini par la recherche des trois SNP les plus fréquents (cf. plus haut). Ces discordances peuvent donc s'expliquer par des variations génétiques localisées dans les séquences codantes, telles que la présence de variants alléliques inconnus ou de mutations rares. De plus, des variations génétiques dans les séquences non codantes du gène *TPMT*, de nature à modifier l'expression et/ou l'activité de la TPMT, sont également possibles [VUCHETICH *et al.* 1995]. Ainsi, la région 5' codante du gène *TPMT*, avec de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription, a été étudiée et une séquence de nucléotides de type *variable number tandem repeat* (VNTR) a été identifiée [SZUMLANSKI *et al.* 1996]. En fonction du nombre de répétitions observées, ce VNTR peut entraîner des variations d'activité TPMT [SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE *et al.* 1998a]. En outre, la présence de polymorphismes au sein d'une répétition du trinuécléotide GCC dans le promoteur du gène *TPMT* a été rapportée chez deux individus ayant une activité TPMT très élevée (phénotype ultra-rapide) [ROBERTS *et al.* 2008]. Cependant, l'influence de ces séquences répétées sur l'activité TPMT semblent mineures comparées à l'importance des SNP dans la séquence

codante du gène *TPMT* [SCHAEFFELER *et al.* 2004; SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE *et al.* 1998b; YAN *et al.* 2000]

Enfin, les discordances génotype-phénotype observées chez certains patients peuvent survenir en cas de transfusions sanguines : en effet, l'activité TPMT étant mesurée sur les globules rouges, le phénotypage n'est pas interprétable durant une période post-transfusionnelle d'environ trois mois, correspondant à la durée moyenne de vie des globules rouges [CHEUNG & ALLAN 2003; KRYNETSKI & EVANS 2000; SCHWAB *et al.* 2001].

## 4 Réponse clinique

*Note : d'une manière générale, ce sous-chapitre comporte (i) une description clinique de l'efficacité des thiopurines suivie de (ii) l'intérêt du dosage des métabolites puis de (iii) l'intérêt de la TPMT pour optimiser l'efficacité. Le même ordre sera utilisé pour présenter les différentes toxicités des thiopurines. Il se poursuivra par une synthèse avec des recommandations globales d'intégration du STP et de la pharmacogénétique dans la prise en charge thérapeutique des patients traités par thiopurines.*

### 4.1 Efficacité/Résistance

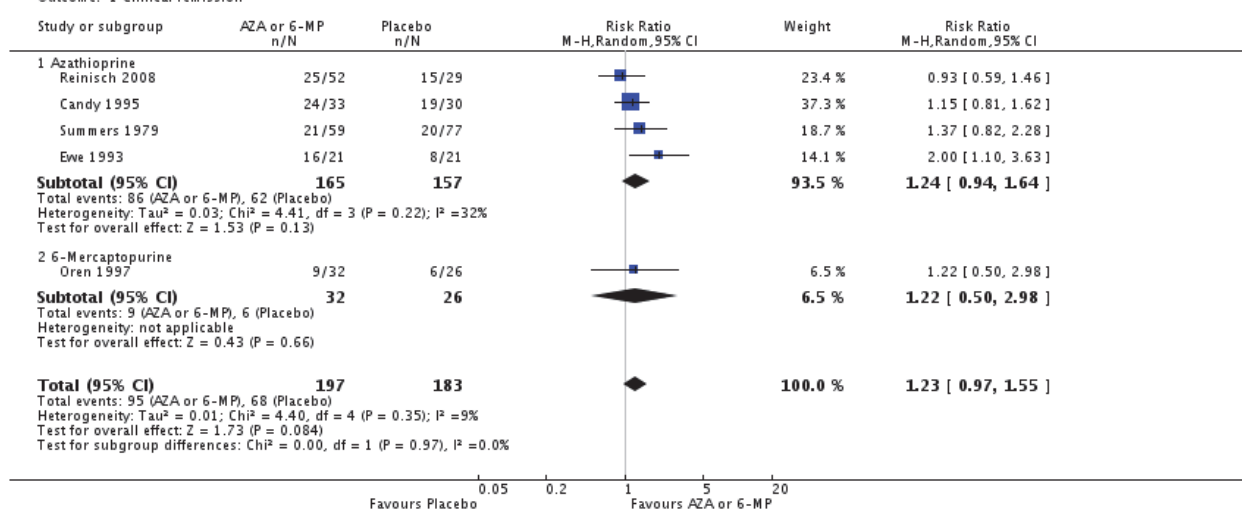
#### 4.1.1 Efficacité clinique

De par leur mécanisme d'action lié à une accumulation des 6-TGN dans les progéniteurs hématologiques, les thiopurines sont des médicaments d'action lente. Une méta-analyse, incluant 367 patients ayant une maladie de Crohn, a rapporté une apparition de l'efficacité entre 8 et 52 semaines, avec une moyenne de 17 semaines après le début du traitement [PEARSON *et al.* 1995]. Pearson *et al.* ont également rapporté que le taux de réponse efficace était positivement associé à la durée du traitement. Globalement, la méta-analyse – 5 études, 380 patients – effectuée par la Cochrane Collaboration pour l'indication « induction de la rémission dans la maladie de Crohn » montre une rémission chez 48% des patients contre 37 % dans le groupe placebo ; cette différence étant non-significative (OR : 1,23 ; IC95% : [0,97-1,55]) [CHANDE *et al.* 2013] (FIGURE 9).

Par ailleurs, la méta-analyse de la Cochrane Collaboration pour l'indication « maintien de la rémission dans la maladie de Crohn » – 7 études, 463 patients – a montré la supériorité de l'azathioprine par rapport au placebo évaluée entre 6 mois et 2 ans (71 % vs. 55 % ; OR : 2,32 ; IC95% : [1,55-3,49] (FIGURE 9). Des posologies faibles (1,0 mg/kg/jour) étaient moins efficaces que des posologies standard (2,0 ou 2,5 mg/kg/jour) [PREFONTAINE *et al.* 2009].

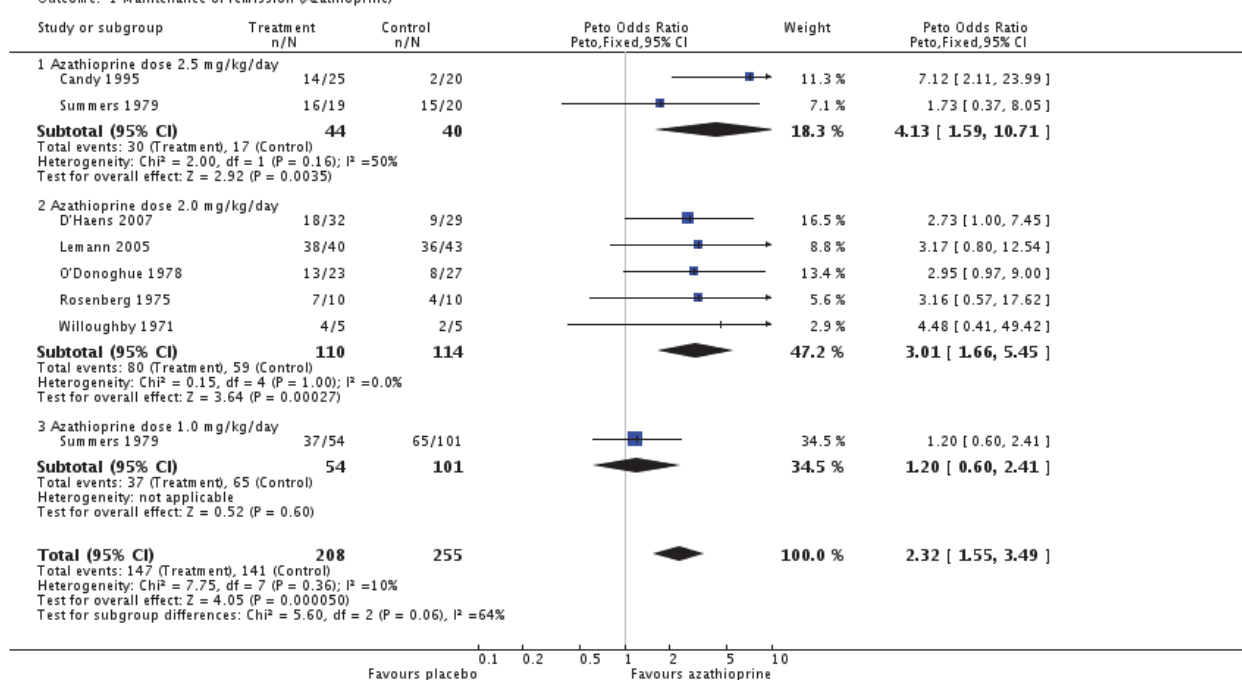
A

Review: Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease  
Comparison: 1 Azathioprine or 6-Mercaptopurine versus placebo  
Outcome: 1 Clinical remission



B

Review: Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease  
Comparison: 1 Maintenance of remission  
Outcome: 1 Maintenance of remission (Azathioprine)



Source : [CHANDE et al. 2013; PREFONTAINE et al. 2009]

## FIGURE 9. Méta-analyses de l'efficacité des thiopurines versus placebo, réalisées par la Cochrane Collaboration

- A. Indication « induction de la rémission dans la maladie de Crohn »
- B. Indication « maintien de la rémission dans la maladie de Crohn »



L'azathioprine n'est pas efficace, seule, pour induire la rémission et est plutôt utilisée pour le maintien d'une rémission préalablement obtenue par corticoïdes et chez des patients corticodépendants [CHANDE *et al.* 2013]. En 2010, l'étude SONIC – essai clinique contrôlé, randomisé, en double insu – incluant 508 patients ayant une maladie de Crohn modérée à sévère corticodépendante a comparé le taux de maintien de rémission sans corticoïdes obtenu par azathioprine, infliximab ou par la combinaison des deux : à 6 mois, 30 %, 44 % et 57 % des patients recevant respectivement de l'azathioprine, de l'infliximab et la combinaison étaient en rémission ( $p < 0,001$ ) [COLOMBEL *et al.* 2010]. Un taux d'efficacité similaire pour l'azathioprine a également été montré dans une étude comparable portant sur 113 patients [LEMANN *et al.* 2006]. Un taux plus élevé de 70 % de patients répondeurs à 18 mois a été trouvé par O'Brien *et al.* dans une étude incluant 70 patients [O'BRIEN *et al.* 1991]. Cependant, cette étude datant de 1991 était rétrospective, basée sur des auto-questionnaires et comportait des patients avec un suivi inférieur à 6 mois. Les différences de taux de réponse observées entre les études s'expliquent notamment par les critères d'évaluation utilisés (durée, population suivie, localisation et sévérité de la maladie, méthode d'évaluation, critères de jugement clinique...).

L'efficacité de l'azathioprine pour le maintien de la rémission à long terme a été évaluée jusqu'à 64 mois [TRETON *et al.* 2009]. L'arrêt du traitement induit un taux de rechute entre 14 % [TRETON *et al.* 2009] et 42 % [O'DONOGHUE *et al.* 1978] l'année suivante, alors que le taux de rechute sous thiopurine dans le cadre d'un maintien de la rémission est de l'ordre de 5 % par an [LEMANN *et al.* 2005; O'DONOGHUE *et al.* 1978]. Une étude rétrospective portant sur 363 patients ayant une MICI a montré qu'approximativement 50 % des patients étaient encore sous thiopurine après 24 mois, et qu'ils n'étaient que 40 % après 60 mois [JHARAP *et al.* 2010]. Ce taux était globalement similaire chez les patients ayant une maladie de Crohn ou une RCH [JHARAP *et al.* 2010]. Les thiopurines ont également prouvé leur efficacité pour réduire les rechutes cliniques post-opératoires dans la maladie de Crohn dans deux grands essais cliniques prospectifs et randomisés, au cours desquels 0 % et 17 % des patients rechutaient sous thiopurine après, respectivement, 12 et 24 mois [ARDIZZONE *et al.* 2004; REINISCH *et al.* 2010].

Enfin, en outre de la résistance « pharmacologique » liée à des concentrations insuffisantes en métabolites actifs, la résistance « vraie » aux thiopurines existe. Dans ce cas, l'augmentation des doses est *a priori* inefficace et un changement de médicament

pour une autre classe pharmacologique est recommandé, après au moins 4 mois de traitement optimisé [SEIDMAN 2003]. Le STP peut alors aider à distinguer une mauvaise observance du traitement ou un sous-dosage, d'une résistance « vraie ».

#### 4.1.2 Optimisation de l'efficacité

##### ➤ *Intérêt du dosage des 6-TGN et des 6-MMPN*

L'azathioprine et la 6-MP présentant une demi-vie plasmatique très courte de l'ordre de 1 à 2 heures, leur dosage plasmatique n'est pas pertinent pour surveiller l'efficacité thérapeutique [LENNARD *et al.* 1986; ZIMM *et al.* 1983]. Ainsi, l'efficacité des thiopurines étant due à la production de leurs métabolites actifs, le STP des thiopurines est fondé sur le dosage intra-érythrocytaire des 6-TGN et des 6-MMPN.

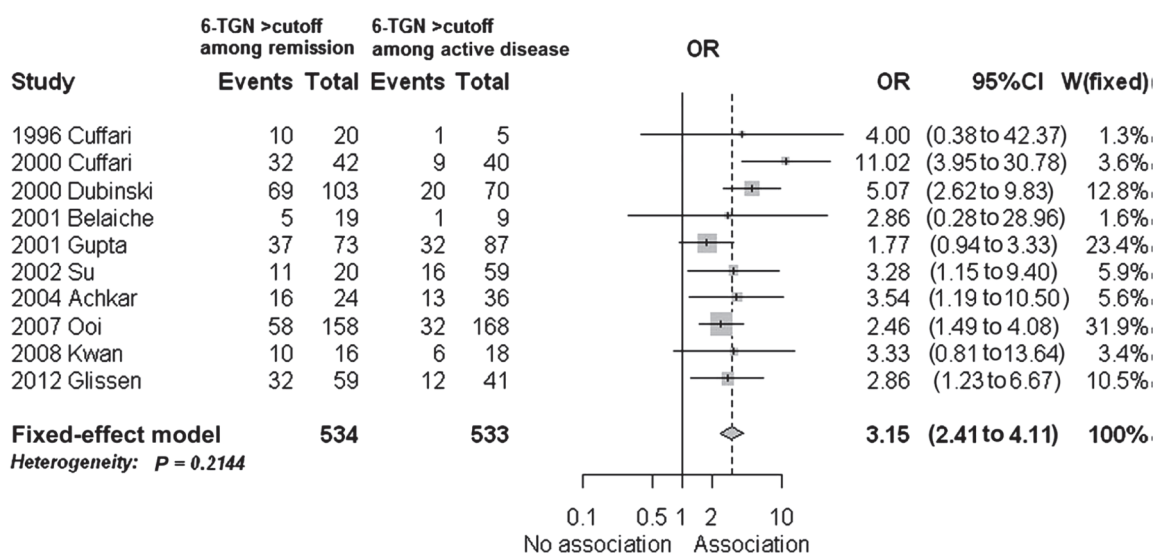
En 1990, Lennard *et al.* ont montré dans une étude sur 95 patients pédiatriques ayant une LAL que les patients avec des concentrations en 6-TGN inférieures à la médiane des concentrations retrouvées – associées à une activité TPMT plus élevée – présentaient des taux de rechutes plus élevés [LENNARD *et al.* 1990]. Par la suite en 1996, dans le cadre des MICI, Cuffari *et al.* ont montré une corrélation négative entre la concentration intra-érythrocytaire en 6-TGN et l'activité de la maladie de Crohn dans un groupe de 25 adolescents [CUFFARI *et al.* 1996]. En 2000, grâce une étude prospective chez des patients pédiatriques recevant des thiopurines pour une MICI, Dubinsky *et al.* définissaient une concentration seuil en 6-TGN de 235 pmol/8x10<sup>8</sup> globules rouges (GR) au-dessus de laquelle il y avait significativement plus de patients répondeurs (OR : 5,0 ; IC 95% [2,6-9,7] ; p<0.001) [DUBINSKY *et al.* 2000]. Dès lors, plusieurs études rétrospectives [GILISSEN *et al.* 2012] et prospectives [CUFFARI *et al.* 1996, 2001; DUBINSKY *et al.* 2000; GUPTA *et al.* 2001; WRIGHT *et al.* 2004] ont rapporté une corrélation entre l'efficacité clinique des thiopurines et la concentration intra-érythrocytaire en 6-TGN, avec une limite inférieure de la zone thérapeutique aux alentours de 235-250 pmol/8x10<sup>8</sup> GR. En 2004, une autre étude prospective de Cuffari *et al.* a montré qu'une concentration en 6-TGN supérieure à 292 pmol/8x10<sup>8</sup> GR était associée à une VPP de 87,5 % pour l'obtention de l'efficacité thérapeutique [CUFFARI *et al.* 2004]. Cependant, dans une étude prospective multicentrique incluant 207 patients, la rémission était significativement plus importante chez les patients ayant des 6-TGN supérieurs à 100 pmol/8x10<sup>8</sup> GR (74% vs. 46%), bien que

globalement, aucune corrélation n'ait été retrouvée entre la concentration en 6-TGN et la réponse clinique [ANSARI *et al.* 2008a].

*A contrario*, en 2007, une étude prospective randomisée incluant 58 patients ayant une MICI et comparant un groupe de patients avec des posologies ajustées en fonction des concentrations en 6-TGN à un groupe de patients avec une posologie standard, n'a pas trouvé de différence en terme de rémission entre ces deux groupes après 16 semaines ; les patients en rémission et ceux ayant une maladie active présentant des concentrations en 6-TGN à 16 semaines similaires [REINSHAGEN *et al.* 2007]. De même, une étude rétrospective de Lowry *et al.* incluant 170 patients ainsi qu'une étude prospective de González-Lama *et al.* incluant 95 patients ont échoué à trouver une association entre efficacité clinique et concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN après 16 semaines de traitement [GONZALEZ-LAMA *et al.* 2011; LOWRY *et al.* 2001; QASIM *et al.* 2002]. Cependant, l'étude rétrospective de Lowry *et al.* incluait des patients hétérogènes et surtout des temps d'évaluation très différents, entre 3 et 102 mois. De plus, González-Lama *et al.* étudièrent uniquement des temps précoces inférieurs à 16 semaines de traitement et leur étude présentait des faiblesses méthodologiques avec notamment un nombre de patients analysés inférieur au nombre de sujets nécessaires pour mettre en évidence une différence de 6-TGN entre patients répondeurs et non répondeurs. Enfin, il a été rapporté chez des patients, adultes et pédiatriques, ayant une MICI que des concentrations en 6-TGN supérieures à 400 pmol/8x10<sup>8</sup> GR, associées à l'absence de réponse, étaient un facteur indépendant prédictif de la résistance aux thiopurines [NGUYEN *et al.* 2013c; ROBLIN *et al.* 2008].

Au final, dans une méta-analyse de 2006, Osterman *et al.* concluaient que les patients ayant des 6-TGN supérieurs à 230-260 pmol/8x10<sup>8</sup> GR étaient plus à même d'être en rémission (62 vs. 36 % ; OR : 3,3 ; IC 95% : [1,7-6,3] ; p<0,001) [OSTERMAN *et al.* 2006]. Cependant cette méta-analyse présentait une grande hétérogénéité, ce qui en limitait les conclusions. En 2014, une nouvelle méta-analyse de Moreau *et al.* concluait que l'hétérogénéité entre les études était principalement due à des différences entre les méthodes de dosage des 6-TGN dans les globules rouges [MOREAU *et al.* 2014]. Les auteurs ont distingué trois techniques de dosage en fonction des méthodes employées pour effectuer l'hydrolyse acide des nucléotides 6-TGN, dont les différences avaient déjà été mises en évidence par Shipkova *et al.* : Lennard & Singleton, Erdmann, Dervieux & Boulieu

[DERVIEUX *et al.* 2005; ERDMANN *et al.* 1990; LENNARD & SINGLETON 1992; SHIPKOVA *et al.* 2003]. En incluant uniquement les 10 études dont les 6-TGN avaient été déterminés par la méthode de Lennard & Singleton, cette méta-analyse concluait que des concentrations en 6-TGN supérieures à 230-260 pmol/8x10<sup>8</sup> GR étaient significativement associées à la rémission clinique (OR : 3,15 ; IC95% : [2,41-4,11] ; p<0,0001) [MOREAU *et al.* 2014].



Source : [MOREAU *et al.* 2014]

**FIGURE 10. Méta-analyse de la rémission clinique dans les MICI en fonction de concentrations en 6-TGN supérieures à un seuil prédéfini.**

Les études (n=10) de ce Forest plot ont été sélectionnées par la méthode de dosage des 6-TGN (méthode de Lennard & Singleton).

Les résultats discordants peuvent également s'expliquer par le fait qu'au sein des 6-TGN, seul le nucléotide triphosphorylé, le 6-TGTP, issu de la transformation du 6-TGDP par la nucléoside diphosphate kinase (NDPK), est responsable de la réponse clinique [KARNER *et al.* 2010; NEURATH *et al.* 2005; TIEDE *et al.* 2003].

### Ratio métabolique

Dubinsky *et al.* ont proposé, en plus de la concentration en 6-TGN, la prise en compte du rapport des concentrations en 6-MMPN/6-TGN (ratio métabolique) comme marqueur prédictif de l'efficacité. Ainsi, en 2002, ces auteurs ont montré que les patients en échec

thérapeutique présentant des concentrations sub-optimales en 6-TGN, malgré une posologie standard, ne répondent pas systématiquement à une augmentation des doses [DUBINSKY *et al.* 2002]. En effet, une augmentation de la posologie de 50 % en moyenne a permis d'atteindre une rémission chez seulement 27 % des patients, coïncidant avec une augmentation des 6-TGN. Les autres patients présentaient des changements mineurs en 6-TGN, mais surtout une production préférentielle de 6-MMPN, associée à la survenue de cas d'hépatites. Les patients non-répondeurs suite à l'augmentation des doses présentaient un ratio métabolique dit « défavorable », *i.e.* supérieur à 11, aussi bien avant qu'après l'adaptation posologique [DUBINSKY *et al.* 2002]. Ce ratio de 11 a été retrouvé dans une étude prospective de Derijks *et al.* ; un ratio inférieur à 20 a été par la suite proposé par Sparrow *et al.* comme marqueur prédictif de l'efficacité [DERIJKS *et al.* 2004; SPARROW *et al.* 2005]. Chez ces patients – environ 20 % de la population – présentant un métabolisme des thiopurines dévié vers la production des 6-MMPN aux dépens des 6-TGN, il n'a pas été retrouvé d'activité TPMT en moyenne plus élevée que chez les patients présentant un ratio métabolique inférieur à 20, dit « favorable » [VAN EGMOND *et al.* 2012].

➤ *Optimisation de l'efficacité : intérêt de la TPMT*

Les concentrations en 6-TGN associées aux variations du métabolisme des thiopurines, sont principalement sous la dépendance des variations inter-individuelles d'activité TPMT, en lien avec un polymorphisme génétique. Une activité TPMT basse potentialise la production de 6-TGN *via* la voie enzymatique de l'HPRT.

L'étude de Lennard *et al.* de 1990 sur les LAL a montré que les patients moins bons répondeurs aux thiopurines présentaient une activité TPMT plus élevée que les autres et avaient des concentrations en 6-TGN plus faibles [LENNARD *et al.* 1990]. Une corrélation négative ( $r=-0,47$  ;  $p<0,005$ ) entre activité TPMT et concentrations en 6-TGN avait déjà été établie par cette même équipe dans un précédent article [LENNARD *et al.* 1987]. Dans une étude rétrospective portant sur 91 patients traités par azathioprine pour une MICI, Ansari *et al.* ont rapporté que 68 % des patients ayant une activité TPMT inférieure à 14 U/mL GR (phénotype rapide [8-15 U/mL GR]) étaient en rémission contre seulement 31 % des patients avec une activité au-delà de ce seuil (OR : 0,21; IC95% ; [0,06-0.71 ;  $p<0,009$ ]) [ANSARI *et al.* 2002a]. Ce seuil d'activité TPMT a été confirmé par une étude prospective incluant 142 patients de Cuffari *et al.* : les patients présentant une activité

TPMT inférieure à 15,3 U/mL GR (phénotype rapide [12-20 U/mL GR]), associée à des concentrations en 6-TGN élevées, avaient six fois plus de chance d'avoir une réponse efficace – valeur prédictive positive du seuil de 15,3 U/mL : 82,4% ; sensibilité : 77,8 % [CUFFARI *et al.* 2004]. De même, Ansari *et al.* ont montré prospectivement qu'une activité TPMT en dessous de 35 pmol/h/mg d'hémoglobine (phénotype rapide [26-50 pmol/h/mg d'hémoglobine]) était associée à un taux plus élevé de succès thérapeutique par comparaison avec les activités supérieures (81% vs. 43% ;  $p < 0,001$ ) [ANSARI *et al.* 2008a]. En outre des patients ayant un déficit d'activité TPMT préférentiellement associé à une réponse efficace, il apparaît que même parmi les patients avec une activité TPMT élevée (phénotype rapide), et donc avec un génotype *TPMT* sauvage, un seuil d'activité est identifiable pour prédire les répondeurs aux thiopurines. A l'inverse, il semble probable que les patients ayant une activité TPMT très élevée en lien avec des 6-TGN bas soient sous-dosés avec des doses habituelles de thiopurines [CHOCAIR *et al.* 1992; LENNARD *et al.* 1990]. Chez les patients ayant une activité TPMT très élevée – environ 15 % des individus [ANSARI *et al.* 2002a] – la posologie standard d'azathioprine (2,0-2,5 mg/kg/jour) pourrait être insuffisante pour atteindre des concentrations efficaces en 6-TGN et une augmentation de posologie jusqu'à 3,0 mg/kg/jour a été suggérée par Cara *et al.* [CARA *et al.* 2004]. Cependant, une augmentation des doses au-delà de la posologie standard nécessite une surveillance étroite car elle expose les patients à un risque accru de toxicité hépatique et n'est généralement pas efficace, comme décrit précédemment [DUBINSKY *et al.* 2002].

#### 4.1.3 Associations thérapeutiques potentialisatrices des 6-TGN

##### ➤ *Allopurinol*

Chez les patients non-répondeurs et présentant un ratio métabolique défavorable Sparrow *et al.* ont proposé, comme stratégie alternative à l'escalade de doses de thiopurine, une potentialisation de la production de 6-TGN fondée sur une interaction médicamenteuse avec l'allopurinol [SPARROW 2010; SPARROW *et al.* 2005].

L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine, inhibiteur de la XO. L'association de l'allopurinol avec une thiopurine est une contre-indication bien connue provoquant une aplasie médullaire [BERNS *et al.* 1972; KENNEDY *et al.* 1996]. La première utilisation de cette

association à visée thérapeutique a été rapportée pour optimiser un traitement anti-rejet à base d'azathioprine dans les transplantations rénales [CHOCAIR *et al.* 1993]. Plus récemment, l'allopurinol a été utilisé en association aux thiopurines pour dévier le métabolisme des 6-MMPN vers la formation des 6-TGN chez les patients présentant un ratio métabolique défavorable (6-TGN bas et 6-MMPN élevés). Ainsi, une étude pharmacologique préliminaire sur 15 patients associant 100 mg/jour d'allopurinol à une thiopurine selon une dose de 25-50% de la posologie initiale, a permis de doubler les concentrations en 6-TGN et de diviser par six les concentrations en 6-MMPN [SPARROW *et al.* 2005]. Par la suite, une étude clinique pilote testant cette association sur 20 patients ayant une MICI et non-répondeurs aux thiopurines a montré une réduction de l'activité de la maladie et une diminution des corticoïdes, sans toxicité associée [SPARROW *et al.* 2007]. De plus, chez les patients présentant des signes de toxicités hépatiques suite à un traitement par thiopurine, cette association a permis une réversion de l'élévation des transaminases [SMITH *et al.* 2012; SPARROW *et al.* 2007]. Dans une étude rétrospective portant sur 41 patients, Ansari *et al.* ont montré que cette stratégie était non seulement intéressante pour éviter les effets indésirables hépatiques mais également extra-hépatiques dus à de fortes doses de thiopurines, tout en augmentant le taux de patients répondeurs [ANSARI *et al.* 2010]. De plus, cette association médicamenteuse semble sûre et efficace sur une longue période de suivi disponible jusqu'à 42 mois [ANSARI *et al.* 2008b]. Rahhal *et al.* ont également rapporté une résolution des signes hépatiques chez 13 patients pédiatriques ayant initialement une augmentation des transaminases [RAHHAL & BISHOP 2008]. Cette stratégie s'est avérée efficace indépendamment de l'activité TPMT (élevée ou très élevée) [APPELL *et al.* 2012; HOENTJEN *et al.* 2012].

Le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette interaction médicamenteuse n'est pas encore clairement élucidé. Une inhibition de la TPMT par l'allopurinol lui-même, son métabolite primaire, ou un métabolite secondaire l'oxypurinol riboside monophosphate a été proposée, en plus de l'inhibition de la XO afin d'expliquer les variations inverses des 6-TGN et des 6-MMPN lors de l'interaction [DULEY *et al.* 2005]. Cependant, des études *in vitro* et *in vivo* n'ont pas mis en évidence un phénomène d'inhibition de la TPMT [OSELIN & ANIER 2007; SPARROW *et al.* 2007]. Par ailleurs, une étude ouverte prospective a montré que cette association thiopurine-allopurinol entraînait une augmentation de l'activité HPRT : cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation des 6-TGN mais pas avec la baisse concomitante très importante des 6-MMPN [SEINEN *et al.* 2011, 2013a]. Finalement,



un mécanisme biochimique novateur, compatible avec les variations des métabolites observées, a été proposé *in vitro* : l'inhibition de la XO par l'allopurinol potentialise la voie d'une oxydation de la 6-MP par l'AOX dont le produit, le 2-hydroxy-6-MP ou 6-thioxanthine, est responsable d'une inhibition de la TPMT [BLAKER *et al.* 2013]. En effet, il a été précédemment décrit que des métabolites puriniques oxydés pouvaient inhiber la TPMT [DEININGER *et al.* 1994]. De plus, à faibles doses, les thiopurines pourraient préférentiellement être métabolisées par la voie de sauvetage des purines *via* l'HPRT, plutôt que d'être catabolisées par la TPMT : en effet, dans les GR, la TPMT possède une Km environ 17 fois plus élevée que celle de l'HPRT pour la 6-MP, pouvant expliquer des profils métaboliques différents à faibles ou fortes doses [BLAKER *et al.* 2013].

Au total, l'ajout de 100 mg d'allopurinol à un traitement par thiopurine à 25-50 % de la posologie initiale s'est montré sûr et efficace pour optimiser le métabolisme des thiopurines – 6-TGN x2 ; 6-MMPN/6 –, conduisant à une forte réduction du ratio métabolique pour le rendre « favorable » [SPARROW 2010]. Cependant, cette stratégie doit être réservée à des patients bien sélectionnés et dans le cadre d'un suivi thérapeutique très strict.

➤ *Febuxostat*

Un cas d'association entre l'azathioprine et le febuxostat (Adenuric®) chez une patiente allergique à l'allopurinol a été rapporté [DORE *et al.* 2014]. Le febuxostat est inhibiteur non-purinique non-compétitif de la XO en bloquant son site de fixation au molybdène. Ce cas clinique rapporte un effet du febuxostat comparable à celui de l'allopurinol pour potentialiser l'efficacité des thiopurines [DORE *et al.* 2014].

➤ *5-ASA*

Le 5-ASA est fréquemment utilisé dans les MICI pour son effet anti-inflammatoire local, parfois en association avec une thiopurine [VAN BODEGRAVEN & MULDER 2006]. Par ailleurs, une modification du métabolisme des thiopurines induite par le 5-ASA a été décrite, résultant en une augmentation des concentrations en 6-TGN [HANDE *et al.* 2006; SZUMLANSKI & WEINSHILBOUM 1995]. Dans une étude prospective sur 29 patients recevant



une dose stable d'azathioprine au cours du temps, des périodes successives de traitement d'un mois par 2 g puis 4 g de 5-ASA ont entraîné une augmentation des 6-TGN de 243 pmol/8x10<sup>8</sup> GR à, respectivement, 326 pmol/8x10<sup>8</sup> GR (p=0,001) puis à 396 pmol/8x10<sup>8</sup> GR (p=0,011), tout en maintenant des 6-MMPN constants [DE BOER *et al.* 2007]. Cependant, cette combinaison augmente simultanément l'efficacité clinique et le risque de myélotoxicité. L'augmentation observée des 6-TGN est principalement due à une production plus élevée des 6-TGDP et 6-TGTP, ces derniers étant les métabolites les plus actifs pharmacologiquement [DE GRAAF *et al.* 2010]. Concernant le mécanisme d'action, bien que, *in vitro*, une inhibition de la TPMT ait été décrite [SZUMLANSKI & WEINSHILBOUM 1995; XIN *et al.* 2005], les effets *in vivo* du 5-ASA sur la TPMT et les concentrations en 6-MMPN sont contradictoires [DE BOER *et al.* 2007; DILGER *et al.* 2007; DE GRAAF *et al.* 2010; QASIM *et al.* 2002]. Par ailleurs, très récemment, une analyse génétique globale sur génome entier à partir de l'ADN de patients traités par cette association a identifié un SNP sur le gène *SLC38A9* en lien avec les concentrations en 6-TGN [UCHIYAMA *et al.* 2014]. *SLC38A9* code pour un transporteur de la L-glutamine et pourrait potentiellement avoir un rôle dans le transport des médicaments. Cependant, à ce jour, le mécanisme moléculaire de l'interaction thiopurine/5-ASA reste non élucidé et des essais cliniques prospectifs sont nécessaires pour bien définir le bénéfice de cette association [ANDREWS *et al.* 2009].

➤ *Infliximab*

La combothérapie associant l'azathioprine avec un anti-*tumor necrosis factor* (TNF), tel que l'infliximab, s'est révélée efficace pour l'obtention de meilleurs taux de rémission par comparaison avec ces deux molécules utilisées en monothérapie [ARMUZZI *et al.* 2014; COLOMBEL *et al.* 2010; LEMANN *et al.* 2005]. Ainsi, dans l'étude SONIC, les résultats montrent 56,8 % de rémission sans corticoïdes à 26 semaines avec la combothérapie contre 44,4 % pour l'infliximab (p=0,02) et 30,0 % pour l'azathioprine (p<0,001) [COLOMBEL *et al.* 2010]. Pour expliquer le bénéfice obtenu avec la combothérapie, en plus d'une synergie d'effet, une interaction médicamenteuse responsable d'une augmentation des concentrations en 6-TGN a été évoquée [ROBLIN *et al.* 2003]. Cette interaction n'a été retrouvée que durant les trois premières semaines après l'introduction de l'infliximab et ne persiste pas après 3 mois de traitement [ROBLIN *et al.* 2003]. Par ailleurs, dans une étude pédiatrique rétrospective récente, l'infliximab était un facteur indépendant associé à une

augmentation des concentrations en 6-TGN [NGUYEN *et al.* 2013a]. De manière intéressante, cela pourrait être du, au moins en partie, à une augmentation spécifique des métabolites actifs, les 6-TGTP, bien qu'aucun mécanisme moléculaire n'ait clairement été décrit [TEICHGRÄBER *et al.* 2013].

Note : *Les effets indésirables peuvent être regroupés en fonction de leur mécanisme :*

- *les toxicités doses dépendantes, liées aux concentrations intracellulaires en métabolites actifs, qui peuvent se manifester durant toute la période du traitement, et parmi lesquelles la toxicité hématologique est la plus importante ;*
- *les toxicités indépendantes de la dose, non prévisibles, probablement liées à des phénomènes immuno-allergiques et survenant surtout durant les premières semaines de traitement, telles que les pancréatites.*

## 4.2 Toxicité hématologique

### 4.2.1 Clinique

La myélotoxicité est l'effet indésirable des thiopurines le plus fréquent à l'origine de leucopénies modérées (leucocytes entre 2,0-4,0 G/L) et de neutropénies (polynucléaires neutrophiles < 1,5 G/L) [BERGAN *et al.* 1997; CONNELL *et al.* 1993]. Aux posologies usuelles, sa prévalence se situe entre 2 % et 10,5 % des patients traités, selon la durée du suivi et la définition de la leuco-neutropénie [KIRSCHNER 1998; PRESENT *et al.* 1989]. Un suivi rétrospectif de 27 ans incluant 739 patients traités par azathioprine pour des MICI a permis de montrer qu'une leucopénie survenait chez 3,8 % des patients, dont 1,2 % de leucopénies profondes (leucocytes < 2,0 G/L) [CONNELL *et al.* 1993].

La myélotoxicité peut apparaître subitement à n'importe quel moment à partir de deux semaines après le début du traitement [CONNELL *et al.* 1993]. Une numération de la formule sanguine régulière est recommandée tout au long du traitement par l'Agence nationale de sécurité du médicament [ANSM 2010]. En effet, il a été montré qu'elle était le plus souvent normale le mois précédent l'apparition d'une leucopénie profonde [CONNELL *et al.* 1993]. La myélotoxicité des thiopurines est généralement rapidement réversible après l'arrêt du médicament ou une réduction de 50 % de la posologie [CONNELL *et al.* 1993; PRESENT *et al.* 1989]. Une méta-analyse – 66 études, 8302 patients – a montré une incidence de la myélotoxicité de l'ordre de 3 % par patient et par an, et de 0,9 % pour les cas de myélotoxicité sévère définie par un nombre de polynucléaires neutrophiles inférieurs à 1,0 G/L [GISBERT & GOMOLLON 2008]. Cependant, en incluant uniquement les

études avec un suivi inférieur à 12 mois, l'incidence de la myélotoxicité augmente à 11 % par patient et par an [GISBERT & GOMOLLON 2008].

La survenue de myélosuppression sévère, combinant une leuco-neutropénie, une thrombopénie et parfois même une pancytopenie, a été décrite chez des patients traités par thiopurines pour des MICI ou d'autres maladies inflammatoires [BACON *et al.* 1981; BURKE *et al.* 1989; GARDINER *et al.* 2006; GILISSEN *et al.* 2007; JEURISSEN *et al.* 1988; LAWSON *et al.* 1984; SCHWAB *et al.* 2002]. De plus, les cas d'aplasie médullaire peuvent avoir une issue fatale chez environ 1 % des patients développant une myélotoxicité aux thiopurines [GISBERT & GOMOLLON 2008]. Parmi les patients présentant une myélotoxicité, le risque cumulé de développer une infection, notamment de la cavité orale, des muqueuses ou de la peau est de 6,5 % [GISBERT & GOMOLLON 2008]. Enfin, une thrombopénie modérée isolée est également possible, et apparaît chez 2 % des patients traités [CONNELL *et al.* 1993].

#### 4.2.2 Prévention de la toxicité hématologique

##### ➤ *Intérêt du dosage des 6-TGN et des 6-MMPN*

La concentration intra-érythrocytaire des 6-TGN sur laquelle est fondée le STP des thiopurines constitue un biomarqueur indirect de l'accumulation des 6-TGN au sein de la moelle osseuse, qui est à l'origine de la myélotoxicité [BERGAN *et al.* 1997; CUFFARI *et al.* 1996; ROBLIN *et al.* 2008].

Lennard *et al.* ont décrit initialement en 1986 une association entre des concentrations intra-érythrocytaires élevées en 6-TGN et la présence de cas de neutropénie et de myélosuppression suite à un traitement par thiopurine, en lien avec une activité TPMT basse [LENNARD *et al.* 1986, 1987, 1989]. Depuis, d'autres études ont confirmé le rôle des concentrations en 6-TGN élevées dans la survenue de toxicités hématologiques [ANDOH *et al.* 2008; DUBINSKY *et al.* 2000; NGUYEN *et al.* 2010]. La concentration toxique en 6-TGN se situerait aux alentours de 400 pmol/8x10<sup>8</sup> GR bien qu'aucun seuil n'ait clairement été démontré [DUBINSKY *et al.* 2000; HINDORF *et al.* 2006b]. De manière générale, une relation inverse est retrouvée entre la concentration en 6-TGN et le nombre de leucocytes [OHTSUKA *et al.* 2010].

Par ailleurs, des auteurs ont décrit une augmentation du risque de myélotoxicité chez les patients ayant des concentrations intra-érythrocytaires élevées en dérivés méthylés. Dans une étude prospective de Hindorf *et al.* incluant 60 patients, parmi les 10 cas de myélotoxicité observés, seuls 2 patients étaient porteurs d'un déficit en TPMT et les concentrations en 6-TGN n'étaient pas non plus associées au développement des cas de myélotoxicité [HINDORF *et al.* 2006a]. Une régression logistique a permis de mettre en évidence que le seul facteur indépendant associé à la myélotoxicité était la concentration intra-érythrocytaire maximale en 6-MeTIMP (OR : 25,1; IC95% : [1,4-467,1] ; p=0,03), les concentrations en 6-MeTIMP étant en moyenne significativement plus élevées parmi les cas de myélotoxicité (10450 vs. 4550 pmol/8x10<sup>8</sup> GR ; p=0,046) [HINDORF *et al.* 2006a]. De plus, un cas clinique récent a rapporté de manière similaire l'apparition d'une myélosuppression profonde chez un patient ayant des 6-MMPN très élevés à 19000 pmol/8x10<sup>8</sup> GR, en lien avec une activité TPMT très élevée [SEINEN *et al.* 2013b].

➤ *Intérêt de la TPMT*

La concentration intra-érythrocytaire en 6-TGN est inversement corrélée à l'activité TPMT. Ainsi, une activité TPMT basse est fortement associée à des concentrations en 6-TGN élevées potentiellement toxiques [DUBINSKY *et al.* 2000; LENNARD *et al.* 1987, 1989; SCHÜTZ *et al.* 1993, 1996]. Il a été retrouvé une surreprésentation supérieure à 6 fois des patients ayant une activité basse ou intermédiaire parmi les cas de myélotoxicité dus aux thiopurines dans les LAL [EVANS *et al.* 2001]. Les patients ayant une activité TPMT basse, porteurs de deux variants alléliques, ont un métabolisme des thiopurines préférentiellement orienté vers la formation des 6-TGN *via* la voie de l'HPRT et sont, par voie de conséquence, prédisposés à la toxicité hématologique [ANSARI *et al.* 2002a; CAMPBELL *et al.* 2002; GARDINER *et al.* 2006; GISBERT & GOMOLLON 2008; ZELINKOVA *et al.* 2006]. Ces patients sont à très haut risque de myélosuppression potentiellement mortelle s'ils reçoivent une posologie standard en thiopurines [LENNARD *et al.* 1987, 1989]. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'un modèle murin invalidé pour le gène *TPMT* [HARTFORD *et al.* 2007]. Concernant les patients ayant une activité TPMT intermédiaire, hétérozygotes pour le génotype *TPMT*, une large méta-analyse – 47 études, 4306 patients – a montré un risque relatif de développer une leucopénie (leucocytes < 1,0 G/L ou < 4,0 G/L selon les études) environ 5 fois plus important par comparaison aux patients ayant

une activité TPMT élevée (OR : 4,9 ;IC95%, 3,20-5,48; p=0,001) [HIGGS *et al.* 2010]. Cependant, cette méta-analyse incluait des études prospectives et rétrospectives relativement hétérogènes, une définition variable de la leucopénie, moyenne (< 4,0 G/L) à profonde (<1,0 G/L), et différentes méthodes de dosage de l'activité TPMT. Par ailleurs, une réduction de posologie entre 50 % et 90 % peut permettre aux patients ayant une activité TPMT, respectivement, intermédiaire ou basse, de bénéficier d'un traitement par thiopurine en l'absence de toxicité hématologique [ANDERSEN *et al.* 1998; EVANS *et al.* 1991; KASKAS *et al.* 2003; MEGGITT *et al.* 2006].

A l'exception de celle de Dubinsky *et al.* en 2000, la totalité des études cliniques sur la TPMT sont des études rétrospectives. Récemment, une grande étude pharmacogénétique prospective – étude TARGET –, incluant 333 patients et ayant pour but d'évaluer l'intérêt du génotypage de la TPMT pour la prévention des effets indésirables, a comparé un groupe de patients avec une stratégie d'adaptation posologique en fonction du génotype *TPMT* à un groupe contrôle [NEWMAN *et al.* 2011]. Cette étude n'a pas montré de différences dans la survenue de neutropénie ni entre les deux groupes de patients, ni en comparant les patients hétérozygotes aux patients sauvages pour la TPMT. Cependant, il s'est avéré que les patients du groupe contrôle pour lequel le résultat du génotypage n'était pas communiqué au médecin, recevaient des doses initiales d'azathioprine inférieures de moitié (0,8-0,9 mg/kg/jour) aux posologies usuelles [NEWMAN *et al.* 2011]. De plus, les posologies étaient toujours faibles (1,6-1,7 mg/kg/jour) après 4 mois de traitement, en lien avec une absence globale d'efficacité du traitement parmi l'ensemble des patients de cette étude.

Enfin, même si la quasi-totalité des patients présentant une activité TPMT intermédiaire ou faible et traités par une posologie standard en thiopurine vont développer une myélosuppression, un déficit en TPMT n'est retrouvé que chez un quart des patients présentant une myélosuppression [COLOMBEL *et al.* 2000; DEWIT *et al.* 2011].

## 4.3 Toxicité hépatique

### 4.3.1 Clinique

Les toxicités hépatiques induites par les thiopurines peuvent être regroupées en 3 catégories : (i) l'hypersensibilité allergique, (ii) les réactions cholestatiques idiosyncratiques, et (iii) l'hyperplasie nodulaire régénérative (HNR), communément appelée maladie veino-occlusive [GISBERT *et al.* 2007b].

Les toxicités hépatiques dues aux thiopurines se traduisent biologiquement par une augmentation moyenne, transitoire et réversible des transaminases sériques [DUBINSKY *et al.* 2000, 2002]. Les thiopurines peuvent être responsables à la fois de lésions hépatiques cholestatiques et cytolytiques [DE JONG *et al.* 2003]. Cliniquement, Present *et al.* ont rapporté une fréquence d'hépatite de 0,3 % au sein d'une population de 396 patients ayant une MICI et suivis pendant 3 ans [PRESENT *et al.* 1989]. Biologiquement, Kirschner, dans une série de 95 patients pédiatriques, a observé une augmentation des transaminases supérieure à deux fois la limite normale supérieure chez 13,7 % des patients, spontanément résolutive après arrêt du traitement ou diminution de la posologie [KIRSCHNER 1998]. Ces discordances sur l'incidence de la toxicité hépatique sont probablement dues aux différences dans les critères cliniques ou biologiques utilisés pour la définir. La première étude prospective sur l'hépatotoxicité des thiopurines a évalué pendant 9 mois 161 patients ayant une MICI, traités par thiopurines à doses usuelles [BASTIDA *et al.* 2005]. La toxicité hépatique, définie par une augmentation des transaminases sériques supérieure à trois fois la limite normale supérieure, a été observée chez 10 % des patients, avec un risque majoré en cas de co-traitement par corticoïdes [BASTIDA *et al.* 2005]. Par ailleurs, une revue systématique de la littérature, incluant 3485 patients tous suivis rétrospectivement, a estimé une prévalence globale de l'hépatotoxicité à 3,4 %, et une incidence annuelle de 1,4 %, sans définition explicite de l'hépatotoxicité commune à toutes les études [GISBERT *et al.* 2007b]. Une large étude rétrospective de Gisbert *et al.* sur 786 patients a rapporté une prévalence de l'hépatotoxicité – définie par une augmentation des transaminases supérieure à deux fois la limite normale supérieure – légèrement supérieure avec un taux à 5 % et une incidence à 2,6 % par an par patient [GISBERT *et al.* 2007c].

La survenue de l'hépatotoxicité est souvent précoce, avec une médiane comprise entre 1,5 et 3 mois après le début du traitement [BASTIDA *et al.* 2005; BERMEJO *et al.* 2010; HINDORF *et al.* 2006b]. Dans les cas de toxicités hépatiques survenant plus tardivement durant un traitement par thiopurines, d'autres étiologies doivent être préférentiellement recherchées, comme par exemple une hépatite virale ou alcoolique. Il faut également noter que la plupart des patients ont une normalisation spontanée de leurs transaminases sériques malgré la poursuite du traitement. Dans le cas contraire, elle survient après l'arrêt du traitement par thiopurines. Enfin, aucun cas d'hépatite fatale en relation avec un traitement par thiopurine n'a été rapporté [BASTIDA *et al.* 2005; GISBERT *et al.* 2007b, 2007c].

Un autre type de toxicité hépatique aux thiopurines, plus rare, est l'HNR dont les symptômes sont associés à une hypertension portale nécessitant parfois le recours à une transplantation hépatique [NABER *et al.* 1991]. L'HNR est une atteinte des cellules endothéliales entraînant une augmentation de la pression portale [GISBERT *et al.* 2007b]. C'est une complication retardée des traitements par thiopurines, avec un temps médian d'apparition de 50 mois et seul un faible nombre de cas ont été rapportés dans la littérature [DANIEL *et al.* 2005; RUSSMANN *et al.* 2001; SEIDERER *et al.* 2006; SEKSIK *et al.* 2011]. Une étude française sur une série de 37 cas d'HNR consécutives à un traitement par thiopurine a estimé une incidence cumulée de 1,25 % sur 10 ans [VERNIER-MASSOUILLE *et al.* 2007]. Deux facteurs majeurs ont été identifiés, dont la présence isolée entraîne une augmentation du risque d'HNR de 7 fois : le genre masculin et une résection de l'intestin grêle supérieure à 50 cm [SEKSIK *et al.* 2011]. Ces patients à risque devraient avoir une surveillance étroite avec une numération plaquettaire associée à un dosage sérique des transaminases, afin d'établir un diagnostic précoce d'HNR avant l'apparition des symptômes cliniques [SEKSIK *et al.* 2011]. Le dépistage de l'HNR est basé sur un échodoppler abdominal et une fibroscopie gastrique. En cas de suspicion d'HNR, une imagerie par résonance magnétique est recommandée car c'est l'examen présentant le meilleur profil sensibilité/spécificité pour détecter les modifications histologiques en cause dans l'HNR [SEIDERER *et al.* 2005; ZECH *et al.* 2007]. Parmi les autres facteurs prédictifs de l'HNR, il a été retrouvé le génotype *TPMT* hétérozygote, des concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN élevées ou un traitement par 6-TG, bien qu'aucune hypothèse



physiopathologique n'ait été clairement formulée [DE BOER *et al.* 2005; BREEN *et al.* 2005; BUSTER *et al.* 2008; DUBINSKY *et al.* 2003a].

#### 4.3.2 Prévention des toxicités hépatiques

##### ➤ *Intérêt du dosage des 6-MMPN*

Le mécanisme physiopathologique des lésions hépatiques induites par les thiopurines est actuellement mal connu. Bien que certains cas surviennent dans un contexte d'hypersensibilité aux thiopurines, les effets indésirables hépatiques semblent être associés à la présence de concentrations intra-érythrocytaires élevées en dérivés méthylés, notamment les 6-MMPN [CUFFARI *et al.* 1996; DUBINSKY *et al.* 2000, 2002; GILISSEN *et al.* 2004; AL HADITHY *et al.* 2005; NYGAARD *et al.* 2004; SEIDMAN 2003]. Dans une étude prospective incluant 92 patients pédiatriques ayant une MICI, une concentration intra-érythrocytaire en 6-MMPN supérieure à 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> GR a été établie comme valeur seuil au-delà de laquelle il existe un risque 3 fois supérieur (18 % vs. 6 %) de développer une hépatotoxicité [DUBINSKY *et al.* 2000]. De même, Hande *et al.* ont trouvé une corrélation positive ( $p < 0,001$ ) entre des concentrations élevées de 6-MMPN et des valeurs élevées de transaminases [HANDE *et al.* 2006]. Une étude prospective sur 43 patients pédiatriques leucémiques a également rapporté une corrélation identique ( $p < 0,001$ ) [NYGAARD *et al.* 2004]. Cependant, dans une étude prospective regroupant 74 patients ayant une MICI et traités par une thiopurine, 12,2 % d'entre eux avaient des concentrations en 6-MMPN supérieures à 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> GR et aucun n'a développé de toxicité hépatique [GOLDENBERG *et al.* 2004]. Ces résultats sont en accord avec les conclusions d'une étude prospective de Reinshagen *et al.* sur 71 patients dont 28 % avaient des concentrations en 6-MMPN au-delà de 10000 pmol/8x10<sup>8</sup> GR en l'absence de signes de toxicité hépatique [REINSHAGEN *et al.* 2007]. Le niveau de la concentration en 6-MMPN n'est donc pas le seul déterminant de la toxicité hépatique ; très probablement, la durée de l'exposition du patient à des concentrations élevées est à prendre en compte, ainsi que d'autres facteurs encore inconnus [DUBINSKY *et al.* 2000]. L'absence de standardisation dans les méthodes de dosage des 6-MMPN intra-érythrocytaires peut également expliquer une partie de ces discordances [ARMSTRONG *et al.* 2004; AL HADITHY *et al.* 2005].

➤ *Intérêt de la TPMT*

Les dérivés méthylés tels que les 6-MMPN étant produits par la TPMT, il est vraisemblable que les patients ayant une activité TPMT élevée ou très élevée vont préférentiellement avoir un métabolisme des thiopurines orienté vers la production de 6-MMPN plutôt que vers les 6-TGN [DUBINSKY *et al.* 2002; SPARROW *et al.* 2005]. L'activité TPMT mesurée dans les globules rouges étant le reflet de celle retrouvée dans le foie, une activité TPMT très élevée pourrait constituer un facteur prédictif d'hépatotoxicité aux thiopurines [SZUMLANSKI *et al.* 1992]. Cependant, l'activité TPMT n'étant pas le déterminant majeur du ratio métabolique [6-MMPN:6-TGN], des ratios défavorables, associés à des concentrations élevées en 6-MMPN et à un risque hépatique, sont aussi retrouvés chez des patients ayant un phénotype rapide (activité élevée) [VAN EGMOND *et al.* 2012].

➤ *Stratégies d'optimisation thérapeutique pour la prévention des toxicités hépatiques*

Chez les patients ayant un métabolisme des thiopurines préférentiellement orienté vers la production des 6-MMPN et présentant une hépatotoxicité, l'association thiopurine/allopurinol peut être proposée, telle que décrite précédemment. Cette association entraîne une diminution importante des concentrations en 6-MMPN permettant de contrecarrer la toxicité hépatique [ANSARI *et al.* 2008b; LEONG *et al.* 2008; SPARROW *et al.* 2007].

Une autre stratégie d'optimisation thérapeutique chez les patients présentant des effets indésirables hépatiques consiste à fractionner la dose quotidienne en thiopurine en deux prises journalières. Cette stratégie s'est révélée efficace dans une étude préliminaire chez 20 patients [SHIH *et al.* 2012].

Enfin, certains auteurs ont rapporté que la 6-MP présenterait une toxicité hépatique plus faible que l'azathioprine, notamment car elle ne possède pas de groupement imidazole. A l'heure actuelle, il n'y a pas dans la littérature de données suffisantes pour étayer cette hypothèse [BERMEJO *et al.* 2010; GISBERT *et al.* 2007b, 2007c; HINDORF *et al.* 2009].

## 4.4 Toxicité pancréatique

### 4.4.1 Clinique

Les pancréatites liées aux thiopurines sont dues à des mécanismes physiopathologiques d'origine immuno-allergique, indépendamment de la dose administrée, impliquant très probablement le complexe majeur d'histocompatibilité de *classe II* [FRASER *et al.* 2002; HABER *et al.* 1986; AL HADITHY *et al.* 2005; HEAP *et al.* 2014]. Elles sont fréquemment associées à des douleurs épigastriques, nausées, vomissements, syndrome pseudo-grippal, rash, arthralgie et fièvre [DERIJKS *et al.* 2006; AL HADITHY *et al.* 2005; SAHASRANAMAN *et al.* 2008]. Dans une étude rétrospective sur 396 patients, la pancréatite, survenant en moyenne 23 jours après le début du traitement, présentait une prévalence de 3,3 % [PRESENT *et al.* 1989]. Deux autres études ont montré que, respectivement, 3,2 % et 7,4 % des patients traités développaient une pancréatite précocement durant les 4 premières semaines au plus tard [HINDORF *et al.* 2006a; SCHWAB *et al.* 2002]. Un taux similaire de 4 % a été rapporté dans une série de patients pédiatriques [KIRSCHNER 1998]. Très récemment, une très large étude prospective sur des cas de pancréatites induites par les thiopurines incluant 303 patients a rapporté un délai médian d'apparition de 19 jours (IC95% [17-21]) [HEAP *et al.* 2014]. La pancréatite peut être définie uniquement sur la base de critères biologiques comme l'élévation de la lipase et de l'amylase sérique. Ainsi, Dubinsky *et al.* ont rapporté une augmentation de la lipase et de l'amylase chez 8 % des patients traités, alors qu'une pancréatite clinique n'a été observée que chez 1 % des patients dans cette même étude [DUBINSKY *et al.* 2000]. Les pancréatites sont dans la très grande majorité des cas modérées et environ 1,5 % des cas sont responsables d'une défaillance organique [HEAP *et al.* 2014]. A l'arrêt du traitement, les symptômes disparaissent, la lipase et l'amylase sérique redeviennent normales dans les 3 jours en moyenne, et aucune complication telle que la pancréatite chronique n'a été observée [PRESENT *et al.* 1989]. En raison du mécanisme immuno-allergique, les thiopurines ne doivent pas être réintroduites chez un patient ayant déjà présenté une pancréatite, même si des stratégies de réintroduction ont été testées chez des patients en l'absence d'alternative thérapeutique [HABER *et al.* 1986; KIRSCHNER 1998; LEDDER *et al.* 2013].

#### 4.4.2 Prévention de la toxicité pancréatique

➤ *Intérêt du dosage des métabolites*

A ce jour, aucune association n'a été rapportée entre la toxicité pancréatique et les concentrations intra-érythrocytaires en métabolites 6-TGN ou 6-MMPN, ou avec la posologie des thiopurines [DUBINSKY *et al.* 2000; HABER *et al.* 1986]. Cependant, dans une étude prospective, Hindorf *et al.*, ont observé des concentrations en 6-MeTIMP plus faibles chez les patients avec une pancréatite par comparaison aux patients sans pancréatite (1650 vs. 5600 pmol/8x10<sup>8</sup> GR ; p=0,011), sans différence de concentrations en 6-TGN [HINDORF *et al.* 2006a]. Ces résultats restent à confirmer et le lien entre pancréatite et métabolisme des thiopurines devra être clarifié.

➤ *Alternatives thérapeutiques en cas de toxicité pancréatique*

Pour les patients ayant une réaction immuno-allergique à l'azathioprine ou à la 6-MP, telle qu'une pancréatite, la 6-TG a été proposée par certains auteurs [DUBINSKY *et al.* 2001]. La 6-TG est directement transformée en 6-TGN par l'HPRT, en évitant les autres étapes du métabolisme des thiopurines – notamment la TPMT – et la formation de métabolites intermédiaires. Deux études prospectives évaluant un traitement par 6-TG de courte durée ont inclus des patients ayant développé des réactions allergiques à l'azathioprine ou à la 6-MP. Ces patients ont alors reçu de la 6-TG qui a été efficace et bien tolérée, malgré des concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN très importantes [BONAZ *et al.* 2003; DUBINSKY *et al.* 2003b]. Toutefois, l'administration de la 6-TG au long cours principalement dans les leucémies, mais également dans les MICI, a révélé une forte association avec une augmentation des enzymes hépatiques ainsi que la survenue d'une HNR [DUBINSKY *et al.* 2003a]. Cependant, il est encore difficile de conclure si une dose de 40 mg/jour, permettant d'obtenir une concentration en 6-TGN très élevée (médiane : 1200 pmol/8x10<sup>8</sup> GR) est impliquée dans le développement de cette toxicité [HERRLINGER *et al.* 2004]. Au vu de ces résultats, la 6-TG nécessite une évaluation plus approfondie avant de pouvoir être recommandée dans les MICI pour des traitements de longue durée.

## 4.5 Intolérance gastro-intestinale

### 4.5.1 Clinique

L'intolérance gastro-intestinale, se traduisant principalement par des douleurs abdominales, nausées et vomissements, survient généralement durant les premières semaines de traitement, et représente plus de la moitié des effets indésirables aux thiopurines [FRASER *et al.* 2002; HINDORF *et al.* 2006b]. Elle apparaît chez 5 à 20 % des patients traités [ANSARI *et al.* 2008a; HINDORF *et al.* 2006a; KIRSCHNER 1998; REINISCH *et al.* 2010]. L'intolérance gastro-intestinale, bien que n'étant pas un effet indésirable grave, est fortement invalidante, entraîne l'arrêt du traitement chez environ 10 % des patients traités, et pourrait être à l'origine d'une mauvaise adhésion au traitement chez un grand nombre de patients [HINDORF *et al.* 2006b].

### 4.5.2 Prévention de l'intolérance gastro-intestinale

#### ➤ *Intérêt de la TPMT*

Une étude prospective a rapporté une fréquence plus importante de cas d'intolérance gastro-intestinale chez des patients hétérozygotes pour la TPMT par comparaison aux patients porteurs de deux allèles sauvages (37 % vs. 7 % ;  $p < 0,001$ ) [ANSARI *et al.* 2008a]. Marinaki *et al.* ont également mis en évidence un risque augmenté de nausées et vomissements chez les patients hétérozygotes pour la TPMT (OR : 5,5 ; IC95% : 1,4-21,3 ;  $p = 0,02$ ) [MARINAKI *et al.* 2004]. Cependant, le mécanisme d'action liant la TPMT avec l'intolérance gastro-intestinale demeure inconnu. Une relation avec la dose administrée a été évoquée : en effet, une réintroduction à dose plus faible suite à un arrêt du traitement permet une diminution des symptômes, alors qu'une répartition de la même posologie en deux prises par jour ne semble pas avoir d'influence [DOMENECH *et al.* 2005]. Enfin, certains auteurs considèrent que la 6-MP est une alternative thérapeutique efficace pour les patients ayant une intolérance gastro-intestinale à l'azathioprine, suggérant que l'intolérance digestive précoce pourrait être liée au clivage par une GST du dérivé imidazole greffé sur l'azathioprine [BOULTON-JONES *et al.* 2000; BOWEN & SELBY 2000; DOMENECH *et al.* 2005; MCGOVERN *et al.* 2002].

## 4.6 Néoplasies

Un risque de cancer peut apparaître après traitement prolongé par thiopurine, avec la survenue notamment de lymphomes non hodgkiniens ou de cancers cutanés. Ainsi les protocoles utilisés dans le traitement des LAL, comportant de la 6-MP, sont responsables de certaines formes de leucémies myéloïdes secondaires [BOGNI *et al.* 2006]. Une étude observationnelle française sur une cohorte prospective incluant quasiment 20 000 patients ayant une MICI et suivis 35 mois a rapporté une incidence des syndromes lymphoprolifératifs de 0,9 pour 1000 patient-années correspondant à un risque relatif de 5,28 (IC95% : [2,01-13,9] ;  $p=0,0007$ ) par rapport aux patients contrôles ne recevant pas de thiopurines [BEAUGERIE *et al.* 2009]. Un risque relatif similaire de 4,2 (IC95% : [2,5-6,8] ;  $p<0,0001$ ) a été observé dans une étude américaine de cohorte rétrospective incluant plus de 4700 patients ayant une RCH [KHAN *et al.* 2013]. Un traitement au long cours par thiopurine entraîne également une augmentation modérée du risque de cancer de la peau – risque relatif 2,28 (IC95% [1,50-3,45]) [ARIYARATNAM & SUBRAMANIAN 2014]. Le risque néoplasique des thiopurines, probablement en lien avec les cassures des brins d'ADN provoquées par les 6-TGN, pourrait être majoré par un déficit en TPMT car exposant les patients à des concentrations en 6-TGN plus élevées de manière prolongée [Bo *et al.* 1999; HOSNI-AHMED *et al.* 2011; YAN *et al.* 2003]. Cependant, le potentiel oncogène propre des thiopurines est difficilement évaluable en raison de leur utilisation en association avec d'autres molécules, ainsi que de l'immunosuppression qu'elles induisent [SANDERSON *et al.* 2004]. Ce risque de survenue de cancer pourrait être majoré lors de l'utilisation des thiopurines en association avec d'autres médicaments immunosuppresseurs tels que les anti-TNF $\alpha$  [OSTERMAN *et al.* 2014].

## 5 Recommandations thérapeutiques intégrant la pharmacogénétique et le suivi thérapeutique pharmacologique

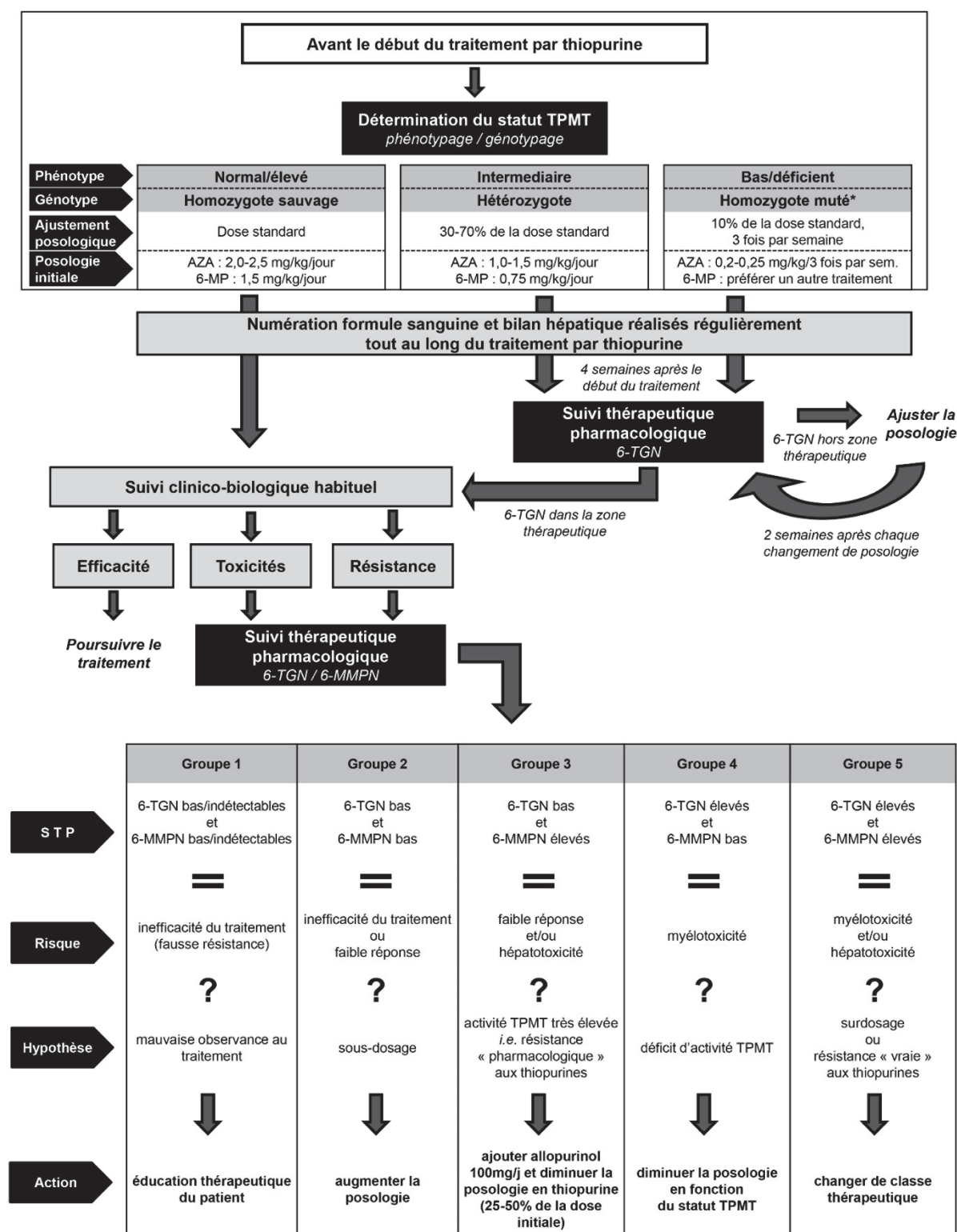
La variabilité inter-individuelle du métabolisme des thiopurines, principalement sous la dépendance du polymorphisme de la TPMT, est associée à des variations de production des métabolites 6-TGN et 6-MMPN, responsables d'une grande hétérogénéité dans la réponse clinique de ces médicaments. Au vu des nombreuses études publiées sur la pharmacogénétique des thiopurines, des recommandations ont pu être établies. Ces recommandations ont fait l'objet d'une synthèse publiée dans une revue de la littérature (cf. Annexe 2) et reprise dans ce manuscrit. Cette synthèse propose dans un premier temps des recommandations thérapeutiques (i) avant le début du traitement pour le dépistage pharmacogénétique des patients à haut risque toxique, puis (ii) au cours de traitement pour le STP (FIGURE 11).

### 5.1 Initiation d'un traitement par thiopurine

Alors que l'EMA ne formule pas de proposition particulière, la FDA recommande depuis 2005 un dépistage des patients présentant un déficit d'activité TPMT, par phénotypage ou génotypage, ayant pour but une prévention de la myélosuppression, avant le début d'un traitement par thiopurine [FDA 2011]. Plus récemment en 2011 aux Etats-Unis, le Consortium pour l'intégration de la pharmacogénétique à la pratique clinique (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, CIPC) financé par *National Institutes of Health* a publié ses premières recommandations pour la TPMT [RELLING *et al.* 2011a, 2013]. Ainsi, alors que les patients avec une activité TPMT élevée (génotype *TPMT* homozygote sauvage) devraient recevoir une posologie standard d'azathioprine de 2,5 mg/kg/jour, chez les patients présentant une activité TPMT intermédiaire (génotype *TPMT* hétérozygote) une diminution à 30-70 % de la posologie standard est recommandée. Une attention toute particulière doit être portée aux patients ayant une activité basse ou indétectable (génotype *TPMT* homozygote muté ou hétérozygote composite). Chez ces patients, une alternative thérapeutique doit être envisagée, ou bien, en cas de nécessité de traitement par thiopurine, une dose réduite à 10 % de la posologie

standard est préconisée, selon un schéma d'administration de trois fois par semaine et associée à un suivi hématologique étroit. De plus, la 6-MP est contre-indiquée dans les situations où il est impossible de moduler de très faibles doses. Enfin, pour ces patients à risque hématologique avec une activité intermédiaire ou basse, un dosage intra-érythrocytaire des 6-TGN est utile 4 semaines après le début du traitement pour valider l'ajustement posologique. En outre, aussi bien la FDA que le CIPC rappelle que le dépistage d'un déficit d'activité TPMT ne se substitue pas à la numération sanguine régulière qui doit être pratiquée tout au long du traitement.





Source : adapté de [CHOUCHANA et al. 2012a]

**FIGURE 11. Algorithme de prise en charge thérapeutique des patients sous thiopurine dans les MICI en fonction de la TPMT et des 6-TGN/6-MMPN**

## 5.2 Patients en cours de traitement par thiopurine

Au vu de la littérature, l'intérêt du dosage des métabolites pour le suivi de l'efficacité des thiopurines reste encore débattu. Par contre l'apport du STP est indéniable pour explorer des cas de résistance ou pour prévenir et expliquer des toxicités hématologiques ou hépatiques. Il permet également de détecter les surdosages, ainsi qu'une évaluation de l'observance du traitement par le patient. Ainsi, avant d'envisager l'arrêt prématuré d'un traitement par thiopurine pour absence de réponse ou toxicité, un dosage des métabolites est utile pour en confirmer l'étiologie et permettre une éventuelle adaptation posologique.

Les résultats du dosage des métabolites 6-TGN et 6-MMPN permettent de classer les patients selon leur profil métabolique, identifiant 5 groupes de patients pour lesquels des recommandations thérapeutiques sont possibles (FIGURE 11).

- Groupe 1 : patients avec une faible observance au traitement

Des concentrations en 6-TGN et en 6-MMPN très faibles ou indétectables sont probablement en lien avec une faible observance. Une éducation thérapeutique peut être proposée à ces patients.

- Groupe 2 : patients présentant un sous-dosage en thiopurine

Une concentration sub-thérapeutique en 6-TGN –  $< 235\text{-}260 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$  – associée à des 6-MMPN faibles peut révéler un sous-dosage. Une augmentation de la posologie en thiopurine est possible pour obtenir une rémission.

- Groupe 3 : patients « pharmacologiquement » résistants aux thiopurines

Une concentration sub-thérapeutique en 6-TGN –  $< 235\text{-}260 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$  – associée à un ratio [6-MMPN:6-TGN] élevé –  $> 11$  ou  $> 20$ , selon les auteurs – chez des patients recevant une posologie standard en thiopurine signe un métabolisme défavorable. Ces patients peuvent être appelés « pharmacologiquement » résistants aux thiopurines. Une augmentation de la posologie ne sera pas en faveur de l'obtention d'une rémission mais majorera le risque de toxicité hépatique due à des concentrations toxiques en 6-MMPN,

> 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> GR. Ces patients peuvent tirer bénéfice d'une optimisation thérapeutique par l'ajout de 100 mg/jour d'allopurinol associé à une diminution des doses de thiopurines à 25-50 % de la posologie initiale. Un suivi biologique hématologique et hépatique étroit est préconisé. Un nouveau dosage des métabolites 4 semaines après l'ajout d'allopurinol est recommandé pour vérifier l'efficacité de cette association médicamenteuse.

- Groupe 4 : patients avec une activité TPMT basse ou intermédiaire

Une concentration élevée en 6-TGN – > 400 pmol/8x10<sup>8</sup> GR, ou plus selon les auteurs – associée à des concentrations basses en 6-MMPN expose les patients à un risque de myélotoxicité et peut révéler la présence d'un déficit d'activité TPMT. Une réponse clinique efficace est souvent observée chez ces patients, mais si la concentration en 6-TGN est trop élevée, une baisse de la posologie est requise. Un nouveau dosage des métabolites 4 semaines après une modification thérapeutique est recommandé. Ces patients sont théoriquement dépistés par une détermination du statut TPMT avant le début du traitement.

- Groupe 5 : patients présentant un surdosage ou une maladie réfractaire

Des concentrations élevées en 6-TGN – > 400 pmol/8x10<sup>8</sup> GR, ou plus selon les auteurs – et en 6-MMPN – > 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> GR – révèlent un surdosage en thiopurine pouvant être à l'origine d'effets indésirables, notamment hématologiques ou hépatiques. Les patients ne répondant pas aux thiopurines après 2-3 mois malgré des concentrations en 6-TGN > 400 pmol/8x10<sup>8</sup> GR sont réfractaires aux thiopurines et une alternative thérapeutique doit être envisagée.

## 6 Autres facteurs pharmacogénétiques

En plus des recommandations thérapeutiques décrites précédemment, d'autres facteurs pharmacogénétiques, notamment des enzymes et transporteurs du métabolisme des thiopurines ont été étudiés aussi bien *in vitro* que dans des essais cliniques, principalement rétrospectifs. A notre connaissance, seul l'ITPA fait l'objet actuellement d'une incorporation dans les pratiques de soins courants de certains centres hospitaliers pour la prévention des effets indésirables.

### 6.1 Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)

L'ITPA est une enzyme ubiquitaire exprimée dans de nombreux tissus, notamment dans les érythrocytes et les leucocytes [HOLMES *et al.* 1979; LIN *et al.* 2001]. L'ITPA est une phosphatase permettant la conversion de l'inosine triphosphate (ITP) en inosine diphosphate (IDP) et inosine monophosphate (IMP), protégeant ainsi la cellule d'une accumulation d'ITP qui pourrait être incorporé dans l'ADN et serait mutagène [LIN *et al.* 2001].

Chez les patients traités par thiopurine, ce cycle futile existe également et l'ITPA hydrolyse le 6-thioinosine triphosphate (6-TITP) en 6-TIMP. Un déficit en ITPA peut ainsi conduire à une accumulation toxique de 6-TITP, responsable d'effets indésirables, possiblement par similitudes structurales avec le 6-TGTP [MARINAKI *et al.* 2004]. Ainsi, un polymorphisme génétique (c.94C>A, p.Pro32Thr, rs1127354) identifié chez 6-7 % des individus caucasiens et africains et présent chez près de 20 % des asiatiques, a été associé à un déficit complet d'activité chez les patients homozygotes et à une activité ITPA résiduelle d'environ 23 % chez les hétérozygotes [MARSH *et al.* 2004; SUMI *et al.* 2002]. Le mécanisme évoqué est l'activation d'un site cryptique d'épissage entraînant une modification de l'épissage entre les exons 2 et 3 et un changement structural de la protéine avec pour conséquence une perte d'activité [HERTING *et al.* 2010; SIMONE *et al.* 2013]. Un autre polymorphisme, intronique (c.124+21A>C ou c.IVS2+21A>C, rs7270101) retrouvé chez 13 % des caucasiens est responsable d'une baisse plus modérée avec une activité ITPA résiduelle à 60 % chez les individus homozygotes mutés [SUMI *et al.* 2002]. Une concordance génotype-phénotype a été effectuée au sein d'une population

caucasienne avec une excellente corrélation en utilisant l'activité seuil de 125  $\mu\text{mol IMP/h/gramme}$  d'hémoglobine pour dépister la présence d'un de ces variants alléliques [SHIPKOVA *et al.* 2006]. Ainsi, dans une étude pharmacogénétique sur 62 patients ayant des effets indésirables aux thiopurines, le SNP c.94C>A sur le gène *ITPA* a été retrouvé chez 17 % des patients, par comparaison à une prévalence de 4 % chez des patients contrôles n'ayant pas d'effets indésirables [MARINAKI *et al.* 2004]. La présence de ce SNP était significativement associée à l'apparition d'exanthèmes (éruptions cutanées) (OR, 10,3 ; IC95% [4,7-62,9] ;  $p=0,02$ ), de pancréatites (OR, 6,2 ; IC95% [1,1-32,6] ;  $p=0,049$ ) et de symptômes pseudo-grippaux (OR, 4,7 ; IC95% [1,2-18,1] ;  $p=0,03$ ), les patients étant, excepté un, tous hétérozygotes pour ce génotype [MARINAKI *et al.* 2004]. L'association du SNP c.94C>A avec des symptômes pseudo-grippaux est également rapportée par Ansari *et al.* dans une étude prospective (OR, 4,13 ; IC95% [1,23-13,94] ;  $p=0,014$ ) [ANSARI *et al.* 2008a]. Egalement, dans une étude prospective incluant 71 patients ayant une maladie de Crohn, les sorties de protocole liées à des effets indésirables à l'azathioprine étaient significativement associées à ce SNP (OR : 3,5 ; IC95% [1,12-10,97] ;  $p=0,046$ ) [ZELINKOVA *et al.* 2006]. Enfin, le rôle de ce SNP dans la survenue d'effets indésirables a également été retrouvé dans une série de 244 enfants ayant une LAL et traités par 6-MP, en association avec une augmentation des concentrations en 6-MMPN [STOCCO *et al.* 2009, 2010]. Cependant, d'autres études ne confirment pas le lien entre les polymorphismes sur *ITPA* et la présence de toxicités aux thiopurines [ALLORGE *et al.* 2005; VAN DIEREN *et al.* 2005; GEARRY *et al.* 2004; KURZAWSKI *et al.* 2009]. Ces études constituaient toutes des séries rétrospectives comportant un faible nombre de patients. De plus, une méta-analyse incluant 751 patients provenant de six études, n'a également pas mis en évidence d'association entre le polymorphisme c.94C>A et la présence d'effets indésirables aux thiopurines [VAN DIEREN *et al.* 2007]. Toutefois, dans cette méta-analyse, l'analyse des effets indésirables de manière globale était relativement hétérogène ( $I^2=56,9\%$ ) et aucune analyse n'a été effectuée pour la survenue de syndromes pseudo-grippaux ou d'exanthèmes.

Au final, l'intérêt du génotypage systématique de l'*ITPA* pour la prévention des effets indésirables aux thiopurines n'a donc pas été clairement démontré, même si plusieurs études rapporte le rôle du polymorphisme c.94C>A dans la survenue de certains effets indésirables précoces tels que les symptômes pseudo-grippaux. Par ailleurs, un dosage de l'activité *ITPA* intra-érythrocytaire, avec une excellente corrélation au génotype, a été

proposé comme une alternative au génotypage pour détecter les patients ayant une activité ITPA déficiente [CITTERIO-QUENTIN *et al.* 2012, 2014].

## 6.2 Glutathion S-transférases (GST)

Les GST, appartenant à la super-famille des enzymes responsables de la conjugaison de nombreux xénobiotiques, sont des enzymes cytosoliques, dont certaines d'entre elles sont abondamment présentes dans le foie. Elles sont impliquées dans la transformation de l'azathioprine en 6-MP [EKLUND *et al.* 2006; HOBARA & WATANABE 1981]. Les isoformes GST-A1, -A2-2 et -M1-1 sont exprimées dans le foie et présentent une forte activité vis-à-vis de l'azathioprine, sous la dépendance d'un polymorphisme génétique [EKLUND *et al.* 2006]. Le gène *GSTA2*, codant pour la GST-A2-2, existe sous la forme de cinq variants alléliques capables de métaboliser l'azathioprine. Plus spécifiquement, le variant *GSTA2\*E* est associé à une activité 3-4 fois plus élevée que les autres variants [ZHANG *et al.* 2010]. Sur la base de ces résultats, des auteurs ont suggéré qu'une activité catalytique GST élevée en présence d'un traitement prolongé par azathioprine pourrait entraîner une déplétion en glutathion et causer des dommages cellulaires [EKLUND *et al.* 2006]. Par ailleurs, une étude clinique incluant 70 patients porteurs d'une MICI ayant pour objet l'étude de l'influence des polymorphismes des isoformes GST-M1, -P1 et -T1, a révélé une association entre GST-M1 et la survenue d'effets indésirables à l'azathioprine [STOCCO *et al.* 2007]. Ainsi, d'une délétion homozygote (*null genotype*) du gène *GSTM1* était associé à une faible mais significative réduction du risque de développer un effet indésirable à l'azathioprine (OR : 0,18 ; IC95% : [0,037–0,72] ; p=0,007), particulièrement une lymphopénie (OR : 0,15 ; IC95% : [0,013–1,08 ; p=0,032) [STOCCO *et al.* 2007]. De plus, cette étude a également rapporté une tendance à la sous-représentation de la délétion homozygote parmi les patients présentant une pancréatite à l'azathioprine [STOCCO *et al.* 2007]. Au final, compte tenu de la prévalence importante des déficits enzymatiques en GST-M1 – environ 50 % chez les caucasiens et les asiatiques –, son implication dans la modulation de la réponse clinique à l'azathioprine devrait faire l'objet d'une large évaluation à l'aide d'essais cliniques prospectifs [COTTON *et al.* 2000; HAMDY *et al.* 2003].

### 6.3 Xanthine oxydase (XO)

La XO est une enzyme cytosolique ubiquitaire, majoritairement présente dans le foie et la paroi de l'intestin grêle [HUH *et al.* 1976]. Elle est à l'origine d'une dégradation précoce des thiopurines entraînant la formation d'acide thiourique, métabolite hydrosoluble qui sera ultérieurement éliminé dans les urines [ANSARI *et al.* 2008c; PARKS & GRANGER 1986]. La XO contribue ainsi majoritairement à l'effet de premier passage des thiopurines. Le déficit en XO est une maladie rare ayant une incidence de 1/70 000, responsable de graves toxicités en cas de traitement par azathioprine à doses usuelles [ANSARI *et al.* 2008c; SERRE-DEBEAUVAIS *et al.* 1995]. Cependant, l'activité XO présente une variabilité inter-individuelle de 4 à 10 fois dans la population générale, pouvant avoir une implication clinique lors de traitements par thiopurine [ANSARI *et al.* 2008c; DERIJKS *et al.* 2006; RELLING *et al.* 1992]. Des variations d'activité XO ont également été décrites en fonction de l'origine ethnique et du sexe [RELLING *et al.* 1992]. Ainsi, la présence de plusieurs SNP associés à une baisse d'activité XO au sein de la population japonaise semble être associée à une modification des concentrations en métabolites thiopuriniques [HAWWA *et al.* 2008; KUDO *et al.* 2008]. Par ailleurs, pour catalyser une oxydation, la XO nécessite la présence d'un cofacteur essentiel, le molybdenum, dont la diminution des concentrations intracellulaires altère l'activité enzymatique XO et pourrait avoir des conséquences lors d'un traitement par thiopurine [SCHWARZ 2005; SMITH *et al.* 2009].

### 6.4 Aldéhyde oxydase (AOX)

L'AOX, enzyme ubiquitaire dans l'organisme, est une autre oxydase impliquée dans le métabolisme précoce des thiopurines [KRENITSKY *et al.* 1972]. Elle catalyse la 8-hydroxylation de la 6-MP, de la 6-MMP ou de l'azathioprine formant ainsi un composé inactif [CLARKE *et al.* 1958]. La présence d'un SNP sur le gène *AOX* a été significativement associée à une absence de réponse clinique à l'azathioprine (OR : 2,54 ; IC95% : [1,06–6,13] ; p=0,035) dans une étude sur 192 patients, malgré des concentrations en 6-TGN similaires entre patients répondeurs et non-répondeurs [SMITH *et al.* 2009]. De plus, cette étude a montré que la combinaison de ce SNP avec l'activité TPMT permettait de prédire une efficacité de l'azathioprine chez, respectivement, 33 % et 86 % des patients, en fonction de la combinaison favorable ou défavorable de chacun de ces deux marqueurs



[SMITH *et al.* 2009]. En outre, cette étude n'a pas trouvé d'association entre ce SNP et la survenue d'effet indésirable. Au final, la prévalence de ce SNP sur le gène *AOX* n'est pas connue dans la population générale et ses conséquences sur l'efficacité doivent être plus largement explorées.

### 6.5 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR)

La 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) est une enzyme du cycle de folates permettant la production de SAM. Des variations d'activité des enzymes du cycle des folates en relation avec la présence de polymorphismes génétiques pourraient avoir un effet sur la régénération de la SAM – cofacteur de la TPMT – consommée lors de la méthylation de la 6-MP par la TPMT [SCHWAHN & ROZEN 2001]. Deux SNP sur le gène *MTHFR*, associés à une baisse d'activité enzymatique, ont une prévalence totale de 20 % dans la population générale [SCHWAHN & ROZEN 2001]. Ainsi, une étude génétique portant sur 86 individus sains a montré une influence de ces deux SNP sur le niveau d'activité TPMT [KARAS-KUZELICKI *et al.* 2010]. Cependant, ces deux SNP ne semblent pas être associés à la présence d'effets indésirables à l'azathioprine dans une étude chez des patients ayant eu une transplantation hépatique [BREEN *et al.* 2005]. Néanmoins, cette étude prenait en compte le génotype du receveur et non du donneur, et ce dernier aurait été plus informatif étant donné que le foie est le principal site pour la méthylation de la 6-MP [SZUMLANSKI *et al.* 1992]. L'effet des polymorphismes sur MTHFR reste donc à analyser dans d'autres études et il est possible qu'il ne se manifeste cliniquement qu'en présence d'une activité TPMT déjà réduite. Par ailleurs, certains médicaments antifolates tels que le méthotrexate ou la triméthoprine, pourraient également avoir un effet sur l'activité TPMT et modifier la synthèse des 6-TGN [BROUWER *et al.* 2005]. Cependant, une étude sur des patients ayant une LAL a montré que la co-administration de méthotrexate était responsable d'une diminution importante des concentrations intracellulaires en 6-TGN, même si des travaux *in vitro* plus récents décrivent une inhibition directe de la TPMT par le méthotrexate [DERVIEUX *et al.* 2003; WENNERSTRAND *et al.* 2013].



## 6.6 Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT)

L'HPRT, codée par le gène *HPRT1* présent sur le chromosome X, est une transférase qui catalyse la conversion de l'hypoxanthine en IMP et de la guanine en guanosine monophosphate (GMP), en transférant un groupement 5-phosphoribosyl provenant du phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) [FU *et al.* 2014]. L'HPRT est impliquée dans la voie de sauvetage des purines permettant le recyclage des nucléotides. Un déficit en HPRT est à l'origine du syndrome de Lesch-Nyhan, responsable de troubles neurologiques sévères dès le plus jeune âge, tels qu'un retard mental et des comportements agressifs d'automutilation [LESCH & NYHAN 1964]. Le déficit complet en HPRT est rare, en lien avec des mutations génétiques sur le gène *HPRT1*, dont la prévalence est de l'ordre de 1/380 000 [FU *et al.* 2014]. Les cellules de ces patients sont totalement insensibles aux thiopurines [KAMATANI *et al.* 1984; ROSMAN *et al.* 1974]. Le déficit partiel d'activité HPRT – 20 % d'activité enzymatique résiduelle –, appelé syndrome Kelley-Seegmiller, est caractérisé par une hyperuricémie responsable de crises de gouttes arthritiques. Excepté ces mutations rares, l'activité HPRT est relativement conservée dans la population générale avec une variabilité inter-individuelle d'un facteur 1,3 à 1,7 voire 2 selon les études [VAN ASSELDONK *et al.* 2010; DING *et al.* 2012; LENNARD *et al.* 1993]. L'HPRT, première enzyme de la voie métabolique menant à la synthèse des 6-TGN, pourrait être l'enzyme limitante de cette voie dont de faibles variations pourraient être en lien avec des modulation de 6-TGN. Ainsi, une première étude a évalué l'influence de quatre génotypes du gène *HPRT1* sur la survenue d'effets indésirables aux thiopurines [PALMIERI *et al.* 2007]. Aucune association n'a été trouvée, en raison d'une fréquence trop faible, inférieure à 1 %, des polymorphismes étudiés. Par la suite, une étude prospective sur 120 patients ayant une MICI a rapporté une activité HPRT significativement plus élevée chez les patients ayant une leucopénie [DING *et al.* 2012]. Parmi ces derniers, une corrélation positive entre l'activité HPRT et les concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN a également été trouvée. Ainsi, les patients ayant une activité HPRT élevée pourrait être plus sensibles aux thiopurines en lien avec une potentialisation de la formation des 6-TGN [DING *et al.* 2012]. Enfin, au cours d'un traitement par thiopurine, une induction limitée de l'activité HPRT a été retrouvée dans des globules rouges et de manière plus importante dans les cellules mononuclées, sans que les conséquences sur la formation des métabolites thiopuriniques n'ait été étudiée [VAN ASSELDONK *et al.* 2010].

## 6.7 Inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH)

L'activité inosine 5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH) est catalysée par deux enzymes codées par deux gènes distincts : *IMPDH1* à l'origine de la forme constitutive, et *IMPDH2* à l'origine de la forme inductible lors de la réplication cellulaire, notamment dans les lymphocytes [GENSBURGER *et al.* 2010]. L'IMPDH est une enzyme de la synthèse *de novo* des purines, intervenant entre l'étape de l'HPRT et celle de la GMPS, et catalysant la conversion de l'IMP en xanthosine monophosphate. Au cours d'un traitement par thiopurine, l'IMPDH transforme le 6-TIMP en 6-TXMP. La variabilité interindividuelle de l'activité IMPDH, dont l'amplitude est d'environ 5 fois dans la population générale, pourrait entraîner une modulation du métabolisme des thiopurines [HAGLUND *et al.* 2008]. Ainsi, une activité élevée a été associée à des concentrations en 6-meTIMP basses, sans influence sur celles des 6-TGN [HAGLUND *et al.* 2008]. Par ailleurs, une insertion de 9 pb au sein du promoteur de l'*IMPDH1*, réduisant son activité *in vitro*, a été retrouvée chez des patients résistants aux thiopurines dans les MICI [ROBERTS *et al.* 2007].

## 6.8 ATP-binding cassette sub-family C member (ABCC4)

Le transporteur d'efflux de nucléotides ABCC4 (*ATP-binding cassette sub-family C member 4*, anciennement appelé MRP4) est exprimé dans de nombreux types cellulaires, notamment les progéniteurs myéloïdes [KRISHNAMURTHY *et al.* 2008; SAMPATH *et al.* 2002]. Dans le cas d'un traitement par thiopurine, ce transporteur permet l'efflux des nucléotides thiopuriniques monophosphorylés, tel que le 6-TIMP ou le 6-TGMP [ZAZA *et al.* 2010]. Il protège ainsi la cellule d'une accumulation de métabolites nucléotidiques cytotoxiques, et peut moduler la sensibilité aux thiopurines pouvant être à l'origine d'une résistance au traitement [JANKE *et al.* 2008; KRISHNAMURTHY *et al.* 2008; SAMPATH *et al.* 2002]. Un SNP sur le gène *ABCC4* (c.2269G>A ; rs3765534), associé à une importante réduction de l'activité du transporteur, a été identifié chez 14 à 18 % de la population japonaise et pourrait être également présent dans d'autres populations [JANKE *et al.* 2008; KRISHNAMURTHY *et al.* 2008]. Chez les patients porteurs de ce SNP, un traitement par thiopurine a entraîné une numération significativement plus faible des leucocytes ainsi que des concentrations intra-érythrocytaires plus élevées en 6-TGN par rapport aux autres patients [BAN *et al.* 2010]. Le risque de développer une leucopénie était également 3 fois plus élevé en

présence de ce polymorphisme sur *ABCC4* (OR : 3,30 ; IC95% : [1,03–10,57] ; p=0,036) [BAN *et al.* 2010]. Par ailleurs, une étude *in vitro* sur des cellules leucémiques CEM sélectionnées pour leur résistance à la 6-MP a révélé une surexpression d'*ABCC4*, en relation avec une sous-expression du transporteur d'influx *SLC28A3*, qui pourraient être associée à des échecs au traitement [PENG *et al.* 2008]. Enfin, une étude d'association sur génome entier (*genome-wide association study*, GWAS) a rapporté une association significative entre des SNP dans les gènes *ABCC4* et *ABCC5*, et des modifications de sensibilité aux thiopurines [MATIMBA *et al.* 2014].

# Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

---

## 1 Définition et étiologie

Les MICI, regroupant la maladie de Crohn et la RCH, sont des maladies chroniques évoluant par poussées inflammatoires, de durée et de fréquence extrêmement variables en fonction des patients, alternant avec des phases de rémission [ABRAHAM & CHO 2009]. Dans la maladie de Crohn, l'inflammation peut être localisée dans tout le tube digestif, de la bouche à l'anus (le plus souvent au niveau de l'iléon) tandis que dans la RCH, elle est localisée au niveau du rectum et du côlon. L'inflammation de la muqueuse digestive est à l'origine d'une symptomatologie importante (douleurs abdominales aiguës, troubles digestifs, diarrhées sanglantes, fissures ou abcès péri-anal...) entraînant une altération de la qualité de vie. Il peut également y avoir des manifestations inflammatoires extra-intestinales ainsi qu'un risque infectieux majoré. Les MICI sont souvent diagnostiquées chez les jeunes adultes entre 15 et 30 ans mais peuvent survenir à tout âge ; 15 % des cas concernent des enfants [ABRAHAM & CHO 2009]. Enfin, elles sont associées à un risque accru de cancer colorectal, notamment lorsque des lésions sont présentes au niveau du côlon. Les MICI nécessitent des traitements sur le long terme et souvent tout au long de la vie [KIRSCHNER 1998]. Chez les patients pédiatriques, le retentissement de la maladie est particulièrement important avec des conséquences physiologiques – comme la malabsorption et la dénutrition responsables d'une cassure de la courbe de croissance – et sociales (rupture scolaire) extrêmement délétères. Les MICI touchent principalement les pays occidentaux et c'est en Europe qu'il y a le plus de cas recensés avec une prévalence de 827 cas pour 100 000 personnes, soit environ 2,5 millions de patients, dont 200 000 en France [MOLODECKY *et al.* 2012]. De plus, l'incidence de ces maladies augmente à travers le globe en faisant désormais une maladie planétaire [MOLODECKY *et al.* 2012].

L'étiologie des MICI n'est pas parfaitement connue actuellement mais est très probablement plurifactorielle. Plusieurs hypothèses ont été évoquées en lien avec une bactérie pathogène non-identifiée ou une réaction immunologique vis-à-vis du

microbiote intestinal [KHAN *et al.* 2011]. Cette maladie étant en progression dans les pays industrialisés, un rôle de l'environnement (pollution, hygiène, alimentation, microbiote) est également largement suspecté. Plus vraisemblablement, une interaction particulière entre une vulnérabilité familiale et l'environnement, notamment l'environnement microbiotique intestinal entraîne le développement d'une MICI. Ainsi, une centaine de gènes de prédisposition ont été identifiés parmi lesquels *IL23R*, *IL12B*, *IFNG* ou encore *STAT3* [ABRAHAM & CHO 2009]. Une récente étude sur génome entier (GWAS) impliquant 75000 cas de MICI a identifié des gènes en relation avec d'autres maladies dysimmunitaires telles que la spondylarthrite ankylosante ou le psoriasis) [JOSTINS *et al.* 2012]. Cette étude a également révélé des associations entre des loci de susceptibilité aux MICI et des voies métaboliques de réponse aux infections mycobactériennes, ayant pu entraîner une sélection naturelle au cours des siècles. Plus particulièrement, le gène *NOD2/CARD15* qui code pour un récepteur intracellulaire aux lipopolysaccharides et aux peptidoglycanes – cette protéine intervient dans l'immunité innée, à la fois dans l'activation cellulaire par la voie NFκB et en potentialisant l'apoptose cellulaire par la voie de la caspase 9 – a été identifié comme un gène de susceptibilité dans la maladie de Crohn. Certaines mutations identifiées multiplient par 40 le risque de développer cette maladie [ABRAHAM & CHO 2009; HUGOT *et al.* 2001].

## 2 Prise en charge thérapeutique des MICI

La prise en charge thérapeutique d'un patient atteint d'une MICI prend en compte l'activité, la localisation et le comportement de la maladie. Les différentes approches thérapeutiques possibles doivent être discutées avec le patient. L'évaluation de l'activité de la maladie est parfois plus difficile dans la maladie de Crohn que dans la RCH, car les symptômes, tels que la douleur ou la diarrhée, peuvent être dus à d'autres causes qu'une maladie évolutive [DIGNASS *et al.* 2010]. L'évaluation clinique seule n'est donc pas suffisante pour apprécier l'activité d'une MICI et requiert une exploration complémentaire, basée sur des marqueurs de l'inflammation et/ou l'endoscopie, avant la mise en route d'un traitement [COLOMBEL *et al.* 2010; DIGNASS *et al.* 2010].

Le choix d'un traitement adapté est toujours conditionné par la balance bénéfique/risque, la réponse clinique à un traitement précédent et la présence de manifestations extra-

intestinales ou de complications. Il faut également garder à l'esprit que, pour les patients ayant une maladie moyennement active, une des options thérapeutiques est de ne pas donner de traitement [DIGNASS *et al.* 2010]. En effet, deux méta-analyses fondées sur des études randomisées contrôlées montrent que, dans la maladie de Crohn et dans la RCH, respectivement 18 % [IC 95% : 14-24 %] et 15 % [IC 95% : 10-21 %] des patients obtiennent une rémission avec un placebo [Su *et al.* 2004, 2007]. Plus particulièrement au cours de la RCH, les saignements rectaux peuvent être associés à une notion de relative urgence thérapeutique nécessitant des traitements locaux, même si aucun traitement systémique n'est recommandé [DIGNASS *et al.* 2012].

L'objectif des traitements dans les MICI est dans un premier temps l'induction de la rémission puis, dans un second temps, son maintien pour éviter les rechutes et le recours à la chirurgie. En pratique, deux stratégies s'opposent et l'adhésion du patient aux choix du thérapeute est indispensable quelle que soit l'option choisie [DIGNASS *et al.* 2010] :

(i) la stratégie ascendante « *set-up* » classique débutant par des molécules de première ligne peu toxiques ; des médicaments plus puissants seront introduits par la suite en cas d'échec ; dans la maladie de Crohn, cette stratégie débute en général par des salicylés à fortes doses – bien que peu efficaces –, suivis par des corticoïdes, puis l'azathioprine, le méthotrexate et enfin les anti-TNF.

(ii) la stratégie « *top-down* » plus novatrice, qui consiste à débiter avec des traitements puissants (tels que les immunosuppresseurs ou les anti-TNF) afin de réduire rapidement l'inflammation et les symptômes, puis de maintenir par la suite une rémission avec des traitements moins agressifs. Cette seconde stratégie est à privilégier chez les patients souffrants de symptômes dus à une maladie active ; dans la maladie de Crohn, elle consiste à débiter par une combothérapie azathioprine/anti-TNF, éventuellement associée à des corticoïdes.

## 2.1 Anti-inflammatoires coliques

### 2.1.1 Aminosalicylés

Les aminosalicylés sont représentés par deux molécules en France : la mésalazine ou acide 5-aminosalicylique (5-ASA) (Pentasa®, Rowasa®, Fivasa®, Dipentum®, Quadrasa®) et sa

pro-drogue, la sulfasalazine (Salazopyrine®). La mésalazine existe sous différentes formes galéniques en fonction des indications : comprimés *per os*, suspension pour lavement ou suppositoires. Quand ils sont administrés *per os*, ils sont préférentiellement absorbés au niveau du colon, ce qui se traduit par une efficacité quasi nulle dans la maladie de Crohn plus souvent localisée au niveau de l'intestin grêle. Ils sont éliminés dans les fèces et dans les urines, sous forme inchangée ou acétylée. La mésalazine a une action topique anti-inflammatoire sur les cellules épithéliales coliques où elle est également métabolisée [DIGNASS *et al.* 2012]. Un passage systémique de ces médicaments n'est pas nécessaire. Historiquement, les premiers essais cliniques ont montré une efficacité des aminosalicylés dans les MICI. Cependant, une méta-analyse incluant trois essais randomisés contrôlés contre placebo chez des patients ayant une maladie de Crohn active a montré une supériorité très modeste par rapport au placebo [HANAUER & STRÖMBERG 2004]. En conséquence, dans la maladie de Crohn, la mésalazine n'est pas recommandée [DIGNASS *et al.* 2010]. Dans la RCH, au contraire, sur la base de deux méta-analyses, les aminosalicylés ont une efficacité démontrée par rapport au placebo dans l'induction de la rémission et la prévention des rechutes [FEAGAN & MACDONALD 2012; FORD *et al.* 2011]. Il semble qu'aucune forme galénique ne soit supérieure aux autres. La mésalazine est globalement bien tolérée et les effets indésirables, apparaissant chez environ 15 % des patients, se manifestent principalement par des diarrhées (3 %), maux de tête (2 %), nausées (2 %) ou éruptions cutanées (1 %). La sulfasalazine, qui possède un groupement sulfamide associé au 5-ASA, est, en plus des effets indésirables sus-cités, responsable de réactions allergiques connues pour cette classe thérapeutique (éruptions cutanées, fièvre, hyper-éosinophilie, anémie hémolytique...).

### 2.1.2 Corticoïdes locaux par voie rectale

Ils sont représentés par la bétaméthasone (Betnesol® soluté rectal) et l'hydrocortisone (Colofam® mousse rectale). Ils ont une action anti-inflammatoire localisée sur la muqueuse intestinale et présentent une efficacité remarquable dans les poussées aiguës de RCH ou des formes rectales et coliques gauches de la maladie de Crohn. Leur faible passage systémique et leur utilisation transitoire expliquent qu'ils sont très bien tolérés.

## 2.2 Corticoïdes systémiques

Les corticoïdes utilisés dans les MICI sont principalement la prednisone (Cortancyl®) et le budésonide (Entocort®) aux posologies respectives de 0,5-0,75 mg/kg/jour et 9 mg/jour. Le budésonide et les corticoïdes classiques (prednisone, prednisolone, méthylprednisone) sont efficaces pour induire la rémission dans la maladie de Crohn [SANDBORN *et al.* 2007a; SEOW *et al.* 2008]. *A contrario*, le budésonide n'est pas utilisé pour induire la rémission dans la RCH où son efficacité est moindre par rapport à la mésalazine [SHERLOCK *et al.* 2010]. Seul les corticoïdes classiques sont efficaces pour induire la rémission dans les formes graves de RCH [BERNAL *et al.* 2006]. Enfin, les corticoïdes sont inefficaces pour le maintien de la rémission à long terme [STEINHART *et al.* 2003].

Le budésonide est la molécule de choix pour les formes moyennes et modérées de la maladie de Crohn car elle présente moins d'effets indésirables que la prednisone (RR : 0,64 ; IC 95% : [0,54-0,76]), même si elle est légèrement moins efficace que cette dernière (RR : 0,86 ; IC 95% : [0,76-0,98]) [SEOW *et al.* 2008]. Dans les formes sévères, la prednisone est plutôt recommandée en raison de son efficacité supérieure [DIGNASS *et al.* 2010].

L'efficacité des corticoïdes doit être contrebalancée par leurs effets indésirables observés chez environ 33 % et 55 % des patients, respectivement, pour le budésonide et la prednisone [RUTGEERTS *et al.* 1994]. Les effets précoces sont de types cutanés (acné, hypertrichose), métaboliques (rétention hydro-sodée et œdèmes, intolérance au glucose), endocriniens (syndrome « cushingoïde »), digestifs ou psychiques (troubles du sommeil et de l'humeur). Lors d'un usage prolongé au-delà de 12 semaines, des troubles physiologiques plus profonds s'installent comme l'ostéoporose, des amyotrophies ou faiblesses musculaires, et un risque infectieux majoré ; de plus chez les enfants, le risque majeur est une cassure de la courbe de croissance, pouvant déjà être altérée par l'histoire naturelle de la MICI.

Enfin, au moment de l'arrêt des corticoïdes, un syndrome de sevrage peut apparaître avec notamment une insuffisance surrénale aiguë ou une augmentation de la pression intracrânienne. Ils sont donc arrêtés progressivement avec une décroissance sur plusieurs semaines. Pour éviter l'apparition d'une dépendance prolongée aux corticoïdes, la décroissance et l'arrêt doivent être prévus dès l'instauration du traitement.



L'introduction d'un traitement au long cours, par immunosuppresseurs par exemple, en même que temps que l'introduction des corticoïdes facilitent leur sevrage par la suite [DIGNASS *et al.* 2010].

## 2.3 Antibiotiques

Les antibiotiques ont été prescrits dans les MICI pour induire la rémission, afin de moduler le microbiote intestinal, en lien avec une hypothèse infectieuse et une perturbation de la flore intestinale. Les molécules testées étaient principalement des antituberculeux, des macrolides, des fluoroquinolones et le métronidazole. Une méta-analyse de la littérature rapporte une très légère supériorité des antibiotiques par rapport au placebo pour induire la rémission dans la maladie de Crohn (RR=0,85 ; IC 95% : [0,73-0,99] ; p=0,03) et dans la RCH (RR=0,64 ; IC 95% : [0,43-0,96]) [KHAN *et al.* 2011]. Cependant, les études incluses présentant une hétérogénéité relativement importante avec des différences dans les molécules utilisées, les résultats sont difficilement interprétables [KHAN *et al.* 2011].

A ce jour, les conférences de consensus thérapeutiques dans les MICI ne recommandent pas l'usage des antibiotiques pour l'induction de la rémission [DIGNASS *et al.* 2010, 2012]. Les antibiotiques sont plutôt prescrits pour traiter des complications infectieuses, des symptômes dus à une prolifération bactérienne ou des lésions péri-anales, leur indication principale étant le traitement des colites à *Clostridium difficile*, notamment par vancomycine et métronidazole [DIGNASS *et al.* 2010; HASHASH & BINION 2014].

## 2.4 Immunosuppresseurs

### 2.4.1 Thiopurines

La première utilisation d'une thiopurine pour le traitement d'une MICI – la RCH – date de 1962 pour la 6-MP et de 1966 pour l'azathioprine [BEAN 1962; BOWEN *et al.* 1966]. Depuis, les thiopurines sont fréquemment prescrites dans ces indications et on estime qu'environ un patient sur deux ayant une MICI a déjà reçu des thiopurines [BEAUGERIE *et al.* 2009; COSNES *et al.* 2005].

**Maladie de Crohn**

Corticorésistance – Corticodépendance  
 Poussée inaugurale traitée par corticoïdes  
 Atteinte oeso-gastro-duodénale  
 Atteinte étendue (>100 cm) de l'intestin grêle  
 Lésions ano-périnéales complexes  
 Rechute dans l'année suivant une poussée iléo-caecale sévère ou une poussée colique  
 Rechute dans les 3 mois suivant toute poussée

**Rectocolite hémorragique**

Corticorésistance – Corticodépendance  
 Poussées fréquentes chez des patients recevant un traitement optimal par le 5-ASA  
 Poussées fréquentes chez des patients ne tolérant pas le 5-ASA  
 Rémission obtenue par la ciclosporine  
 Rémission obtenue par un traitement corticoïde intraveineux intensif (facultatif)

Source : adapté de [DIGNASS et al. 2010, 2012]

**TABLEAU 2. Indications des thiopurines dans les MICI selon les recommandations européennes de l'ECCO**

Dans les formes modérées à sévères des MICI, alors que les corticoïdes sont le traitement de référence de l'induction de la rémission, les thiopurines constituent la base du traitement du maintien de la rémission. En Europe et aux Etats-Unis, elles sont prescrites en cas d'échec des traitements de première intention, en particulier chez les patients corticodépendants ou chez ceux qui ne répondent pas aux corticoïdes systémiques [DIGNASS *et al.* 2010; TERDIMAN *et al.* 2013]. Dans la maladie de Crohn, aussi bien l'azathioprine que la 6-MP ont prouvé leur efficacité pour le maintien de la rémission et le sevrage aux corticoïdes dans les formes cortico-dépendantes [PREFONTAINE *et al.* 2009] ou pour la prévention des rechutes post-chirurgicales [PEYRIN-BIROULET *et al.* 2009]. En revanche, les thiopurines en monothérapie n'ont pas démontré leur efficacité pour induire la rémission et doivent être associées à l'infliximab si une alternative aux

corticoïdes est recherchée dans cette indication [CHANDE *et al.* 2013]. Concernant la RCH, l'efficacité des thiopurines a été prouvée dans le maintien de la rémission mais leur utilisation n'est recommandée qu'en cas d'échec des anti-inflammatoires locaux tels que la mésalazine ou sulfasalazine [TIMMER *et al.* 2012].

#### 2.4.2 Anti-TNF

Les anti-TNF sont des anticorps dirigés contre le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) et sont actuellement représentés par 4 médicaments indiqués dans les MICI (Tableau 3). Tous les anti-TNF actuellement disponibles semblent avoir une efficacité clinique comparable et des effets indésirables similaires. Le choix de la molécule dépend donc principalement de la voie et du rythme d'administration, du coût et de la préférence du patient [DIGNASS *et al.* 2010].

DCI (spécialité)	Type	Voie	Posologie	Demi-vie	Indications
<b>Infliximab (Remicade®)</b>	anticorps IgG1 monoclonal murin-humain	IV perfusion lente (2h)	5 mg/kg à S0, S2, S6 puis toutes les 8 semaines	8-12 jours	Maladie de Crohn adulte et pédiatrique RCH adulte et pédiatrique [EMA 2012a]
<b>Adalimumab (Humira®)</b>	anticorps IgG1 monoclonal humain	SC stylo injecteur	80 mg puis 40mg toutes les 2 semaines	10-20 jours	Maladie de Crohn adulte et pédiatrique [EMA 2013]
<b>Certolizumab pegol (Cimzia®)</b>	Fragment Fab d'anticorps monoclonal « pégylé »	SC stylo injecteur	400 mg à S0, S2, S4 puis 200 mg toutes les 2 semaines	14 jours	Refus d'AMM dans la maladie de Crohn par l'EMA mais autorisation par la FDA (EMA 2008; FDA 2008)
<b>Golimumab (Simponi®)</b>	anticorps IgG1 monoclonal humain	SC stylo injecteur	200 mg à S0 puis 100 mg à S2 puis 50-100mg toutes les 4 semaines	12 jours	RCH adulte [EMA 2014a]

**TABEAU 3. Caractéristiques des anti-TNF utilisés dans les MICI**

- Mode d'action

Ils permettent de diminuer l'inflammation chronique au niveau de la muqueuse intestinale ainsi que la production du facteur pro-inflammatoire  $\text{TNF}\alpha$ , qui est augmenté chez les patients atteints de MICI [MURCH *et al.* 1993].

- Pharmacocinétique

Après administration, ils sont distribués dans le compartiment extracellulaire et pénètrent peu dans les cellules du fait de leur très haut poids moléculaire et de leur relative hydrophilie [ORDAS *et al.* 2012]. Leur clairance est assurée par les cellules du système réticulo-endothélial *via* des récepteurs d'endocytose permettant la formation d'endosomes protéolytiques [WANG *et al.* 2008]. L'élimination rénale, par filtration glomérulaire, ou biliaire est quasi-inexistante [WANG *et al.* 2008]. La demi-vie d'élimination augmente avec le degré d'humanisation de l'immunoglobuline. Ainsi, l'infliximab possède une demi-vie de 8-12 jours, alors que celle de l'adalimumab est de 10-20 jours [ORDAS *et al.* 2012]. Concernant le certolizumab, il est pégylé, c'est-à-dire conjugué avec une molécule de polyéthylène glycol qui augmente sa demi-vie d'élimination (14 jours) par différents mécanismes, notamment une diminution de la clairance rénale, de la protéolyse et de l'immunogénicité par un mécanisme d'échappement au système réticulo-endothélial [EMA 2014b].

- Efficacité

De nombreuses études cliniques ont montré l'efficacité de ces médicaments pour l'induction et le maintien de la rémission dans la maladie de Crohn avec d'importants taux de réponse, dès les 4 premières semaines de traitement [COLOMBEL *et al.* 2010, 2007; D'HAENS *et al.* 2008; HANAUER *et al.* 2006; SANDBORN *et al.* 2007b; SANDS *et al.* 2004; SCHNITZLER *et al.* 2009]. Ces résultats ont été confirmés par différentes méta-analyses [AKOBENG & ZACHOS 2004; BEHM & BICKSTON 2008; PEYRIN-BIROULET *et al.* 2008]. Les anti-TNF sont également utilisés en association (désignée sous le terme de combothérapie) avec l'azathioprine, dans des stratégies thérapeutiques « *top-down* » (cf paragraphe 4.1.3), dès l'induction de la rémission dans les formes modérées à sévères. Cette stratégie, comparée à une stratégie classique « *set-up* » fondée sur des corticoïdes suivis par l'azathioprine, a montré sa supériorité sur la cicatrisation endoscopique et la rémission

sans corticoïdes dans la maladie de Crohn [D'HAENS *et al.* 2008]. Une autre étude (SONIC), a montré qu'un meilleur taux de rémission sans corticoïdes à 26 semaines était obtenu par l'association azathioprine-infliximab (56,8 %), par rapport à une monothérapie d'infliximab (44,4 %) ou d'azathioprine (30,0 %) [COLOMBEL *et al.* 2010]. Ainsi, dans les formes sévères de la maladie de Crohn, la combothérapie est d'emblée indiquée et de plus en plus prescrite, alors que la place de l'azathioprine en monothérapie est discutée [COLOMBEL *et al.* 2010]. Il semble fort probable que l'adalimumab, ayant le même mécanisme d'action que l'infliximab, soit également plus efficace en association avec l'azathioprine, qu'en monothérapie.

Concernant la RCH, les anti-TNF sont efficaces pour l'induction de la rémission dans les formes modérées à sévères mais relativement moins que dans la maladie de Crohn [LAWSON *et al.* 2006]. Ils permettent, du moins à court terme, de réduire la fréquence des colectomies. Parmi les facteurs de mauvais pronostic, ont été identifiés l'âge avancé, une sérologie pANCA+/ASCA-, ainsi qu'une signature moléculaire impliquant des gènes de la réponse immunitaire adaptative [ARIJS *et al.* 2009; FERRANTE *et al.* 2007].

*Nota bene* : Le certolizumab pegol bien que recommandé dans la dernière conférence de consensus européenne de l'ECCO a reçu un avis défavorable d'AMM par l'EMA dans la maladie de Crohn pour cause d'efficacité insuffisante, de risque majoré de saignements par rapport aux autres anti-TNF et enfin d'une qualité pharmaceutique des anticorps inconstante [DIGNASS *et al.* 2010; EMA 2008]. Il a cependant reçu un avis favorable d'AMM aux Etats-Unis par la FDA (FDA 2008).

#### - Déterminants biologiques de l'efficacité

De nombreuses études permettent d'établir une relation pharmacocinétique-pharmacodynamie pour les anti-TNF : plus les concentrations plasmatiques résiduelles sont élevées, plus le taux de réponse clinique est important [MASER *et al.* 2006; SEOW *et al.* 2010]. Un des principaux facteurs impliqués dans la perte d'efficacité des anti-TNF est l'apparition d'anticorps contre ces molécules, entraînant une baisse des concentrations libres circulantes d'anti-TNF [ORDAS *et al.* 2012]. Dans cette situation, un relai vers une autre molécule de la classe des anti-TNF permet de récupérer une efficacité chez 92 % des

patients traités, quand une augmentation de la posologie ne sera efficace que chez 17 % des patients [AFIF *et al.* 2010]. A l'inverse, chez les patients ayant des concentrations plasmatiques d'anti-TNF infra-thérapeutiques et en l'absence d'anticorps, une simple augmentation de posologie est efficace pour obtenir une réponse clinique dans 86 % des cas [AFIF *et al.* 2010]. Une autre alternative chez les patients ayant une apparition d'anticorps est l'ajout d'un autre immunosuppresseur tel que l'azathioprine.

#### - Toxicités

Le profil d'effets indésirables des anti-TNF est similaire entre eux [SERGHINI *et al.* 2012]. Un recul de quasiment 10 ans d'expérience dans les MICI est disponible pour l'infliximab et l'adalimumab. Les réactions locales au site d'injection représentent l'effet indésirable le plus courant (douleur, tuméfaction, érythème, prurit...) chez environ 30 % des patients traités [SERGHINI *et al.* 2012]. Concernant les effets indésirables graves, une large méta-analyse a récemment montré qu'il n'y a pas d'augmentation du risque global de décès, d'infection sévère ou de survenue de cancers lors d'un traitement par anti-TNF [COLOMBEL *et al.* 2009]. Cependant, ces résultats sont à analyser avec précaution, notamment pour le risque de survenue de cancers, car ils proviennent d'essais cliniques évaluant souvent une durée de traitement relativement courte. En effet, plus spécifiquement pour l'adalimumab, bien que les essais cliniques ne montrent pas d'augmentation du risque global de survenue d'un cancer, le risque de carcinome cutané épidermoïde est multiplié par 5,26 par rapport à la population générale et le risque de lymphome n'est pas négligeable [COLOMBEL *et al.* 2009]. Le risque de lymphome T hépatosplénique étant particulièrement majoré en cas de combothérapie, cette association est à déconseiller sur le long terme chez les enfants et adolescents [DIGNASS *et al.* 2010]. Concernant le risque infectieux, une attention particulière doit être portée aux infections opportunistes, notamment tuberculose ou infection fongique profonde, qui doivent être recherchées devant un syndrome infectieux inexpliqué [DIGNASS *et al.* 2010]. Enfin, la formation d'auto-anticorps anti-nucléaires de type lupique survient chez environ 19 % des patients lors d'un traitement par adalimumab, sans conséquence clinique dans la très grande majorité des cas [HANAUER *et al.* 2006].

### 2.4.3 Méthotrexate

Le méthotrexate (Novatrex®, Ledertrexate®) est un analogue de l'acide folique possédant une activité antimétabolite. C'est un inhibiteur compétitif de la dihydrofolate réductase bloquant ainsi la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. L'effet anti-inflammatoire du méthotrexate dans les MICI est probablement plutôt expliqué par une inhibition de la synthèse de cytokines et d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, en lien avec une baisse d'adénosine [DIGNASS *et al.* 2010]. Le méthotrexate est prescrit par voie orale, sous-cutanée ou intra-musculaire à la dose de 25mg par semaine [DIGNASS *et al.* 2010]. D'action lente et différée comme les thiopurines, le méthotrexate est efficace en association avec des corticoïdes pour l'induction de la rémission [FEAGAN *et al.* 1995]. D'efficacité comparable aux thiopurines, son usage actuel est plutôt réservé en seconde ligne de traitement, chez les patients réfractaires ou intolérants aux thiopurines ou aux anti-TNF [DIGNASS *et al.* 2010; FRASER 2003; McDONALD *et al.* 2012]. Dans la RCH, peu d'essais cliniques randomisés ont évalué l'intérêt du méthotrexate, qui n'est, pour l'heure, pas recommandé dans cette indication [DIGNASS *et al.* 2012; EL-MATARY *et al.* 2009].

Les effets indésirables se manifestent chez 10-18% des patients traités [FRASER 2003]. Les toxicités digestives précoces peuvent être minimisées par la co-prescription d'acide folique. Les toxicités à long terme sont principalement représentées par l'hépatotoxicité, nécessitant un suivi régulier des transaminases, et des pneumopathies [DIGNASS *et al.* 2010; FRASER 2003].

### 2.4.4 Ciclosporine et tacrolimus

La ciclosporine (Neoral®) et le tacrolimus (Prograf®) sont des inhibiteurs de la calcineurine entraînant une inhibition de la synthèse de cytokines par les lymphocytes T responsable d'un effet anti-prolifératif. Dans la littérature, un seul essai randomisé a montré une efficacité de la ciclosporine par rapport au placebo pour induire la rémission dans la maladie de Crohn chez des patients intolérants ou réfractaires aux corticoïdes, tandis qu'elle a été inefficace pour maintenir la rémission dans une autre étude [BRYNSKOV *et al.* 1989; FEAGAN *et al.* 1994]. L'utilisation du tacrolimus est rapportée uniquement dans des essais ouverts. Ces données limitées font qu'il est impossible de définir des

recommandations pour l'usage des inhibiteurs de calcineurine dans la maladie de Crohn [DIGNASS *et al.* 2010].

Dans le cas de la RCH, une méta-analyse de la Cochrane Collaboration concluant que le nombre d'essais cliniques contrôlés étant trop faible, il n'est pas possible d'établir la supériorité de la ciclosporine par rapport à d'autres traitements pour induire la rémission dans les formes sévères [SHIBOLET *et al.* 2005]. Elle est toutefois utilisable dans les formes sévères de RCH en cas de contre-indication des corticoïdes ou en seconde ligne de traitement afin d'éviter une résection colique [DIGNASS *et al.* 2012].



### 3 Critères d'évaluation de l'activité dans les MICI

#### 3.1 Critères cliniques

Dans les MICI, la rémission clinique doit être évaluée en l'absence de corticoïdes et à l'aide de scores internationalement reconnus et validés : dans la maladie de Crohn, il s'agit du *Harvey-Bradshaw index (HBI)* [HARVEY & BRADSHAW 1980] ou préférentiellement du *Crohn's Disease Activity Index (CDAI)* [BEST *et al.* 1976], considéré comme « gold-standard » et de sa forme pédiatrique, le *Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI)* [HYAMS *et al.* 1991] ; dans la RCH il s'agit du score du *Mayo Clinic Score* [SCHROEDER *et al.* 1987], du *Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UC-DAI ou Sutherland Index)* [SUTHERLAND *et al.* 1987] et du *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)* [TURNER *et al.* 2007] chez les enfants. Ces scores sont basés sur des items cliniques quantitatifs (nombre de selles par jour, présence de sang dans les selles, valeurs biologiques...) et qualitatifs (douleur abdominale, bien être général...). Bien que ces scores constituent des références en recherche clinique, ils n'intègrent pas d'évaluation du patient dans sa globalité. En effet, ils ne donnent pas une part importante à la qualité de vie des patients, alors même que ces pathologies ont un retentissement important sur leur quotidien. C'est une des raisons pour laquelle le *Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ)* a été développé afin de mieux évaluer la qualité de vie du patient et d'intégrer une approche psychologique, sociale et émotionnelle dans la gravité de la maladie de Crohn [IRVINE *et al.* 1994]. Le IBDQ, validé et corrélé au CDAI ( $r = -0.67$ ;  $P < 0.0001$ ), présente l'avantage d'être plus robuste pour évaluer l'efficacité d'un traitement et pour percevoir ses effets sur la qualité de vie du patient [IRVINE *et al.* 1994]. Enfin, la rémission clinique, longtemps considérée comme l'objectif thérapeutique majeur au cours des MICI, a montré ses limites et son inefficacité à modifier l'histoire naturelle de ces affections [STEFANESCU *et al.* 2011]. Le développement de critères intermédiaires (*surrogate endpoints*) alternatifs, tels que des paramètres endoscopiques ou biologiques devrait permettre une meilleure évaluation de la rémission afin d'obtenir une précision plus fiable du pronostic des patients.

Nom du score	Population	Score pour rémission	Critères	Références
<b>Maladie de Crohn</b>				
Harvey-Bradshaw index (HBI)	Adultes et enfants	< 5	Cliniques (interrogatoire et examen)	[HARVEY & BRADSHAW 1980]
Crohn's Disease Activity Index (CDAI)	Adultes	< 150	Cliniques (interrogatoire) et biologiques	[BEST <i>et al.</i> 1976]
Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI)	Enfants	< 10	Cliniques (interrogatoire et examen) et biologiques	[HYAMS <i>et al.</i> 1991]
<b>Rectocolite hémorragique</b>				
Mayo Clinic Score	Adultes	≤ 2	Cliniques (interrogatoire) et endoscopiques	[SCHROEDER <i>et al.</i> 1987]
Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)	Enfants	< 10	Cliniques (interrogatoire)	[TURNER <i>et al.</i> 2007]

**TABEAU 4. Principaux scores utilisés pour évaluer l'efficacité des traitements dans les MICI**

### 3.2 Critères endoscopiques

La rémission endoscopique, c'est-à-dire la « cicatrisation muqueuse endoscopique », est assimilée, dans le meilleur des cas, à la guérison de toutes les lésions inflammatoires et ulcéreuses de la muqueuse intestinale [D'HAENS *et al.* 2009; STEFANESCU *et al.* 2011]. Elle est associée à une diminution des risques de rechute clinique, d'hospitalisation et de chirurgie aussi bien au cours de la maladie de Crohn que de la RCH [PINETON DE CHAMBRUN *et al.* 2010; ROGLER *et al.* 2013; STEFANESCU *et al.* 2011]. Ainsi, dans la maladie de Crohn, une cicatrisation muqueuse précoce est prédictive d'un taux élevé de rémission sans corticoïdes ni immunosuppresseurs à 2 ans [BAERT *et al.* 2010]. Elle pourrait donc devenir l'objectif majeur à atteindre, susceptible de modifier l'histoire naturelle de la maladie, d'autant plus qu'une inflammation muqueuse résiduelle au cours de la RCH est associée à un risque accru de développer un cancer colique à plus long terme [RUTTER *et al.* 2004].

En pratique clinique et dans les essais thérapeutiques, la cicatrisation muqueuse endoscopique est surtout définie par la disparition de toutes les ulcérations visualisées

sur l'ensemble des segments coliques et iléaux examinés [D'HAENS *et al.* 1997]. Avec cette définition, la persistance de lésions moins sévères, comme la fragilité muqueuse, l'aspect granité ou l'érythème, ne sont pas incompatibles avec le statut de « cicatrisation muqueuse endoscopique ». Cependant, en pratique clinique, les limites résident dans le caractère invasif et coûteux des examens endoscopiques requis pour contrôler l'obtention de la cicatrisation muqueuse endoscopique. Pour ce faire, des moyens d'évaluation non endoscopiques de l'activité de la maladie sont en cours de développement, et seront probablement intégrés au sein de scores composites, qui pourront allier des examens morphologiques endoscopiques (vidéocapsule intestinale ou colique) et/ou radiologiques (entéroIRM, coloIRM, échographie), ainsi que des marqueurs biologiques inflammatoires sériques (CRP) et/ou fécaux (lactoferrine, calprotectine) [KOPYLOV & SEIDMAN 2014; SIPPONEN *et al.* 2008; SOLEM *et al.* 2005; STEFANESCU *et al.* 2011]. Enfin, la relativement bonne corrélation de l'endoscopie avec la présence de sang dans les selles et leur fréquence, du moins dans la RCH, font que l'utilité de cet examen invasif est source de débats [HIGGINS *et al.* 2005; TURNER *et al.* 2011].

### 3.3 Critères biologiques

Les critères biologiques reposent principalement sur la protéine C réactive (*C-reactive protein*, CRP) sérique, marqueur de l'inflammation, et des nouveaux biomarqueurs présents dans les selles, dérivés des polynucléaires neutrophiles. Deux anticorps ont également été étudiés et sont plutôt associés à la présence d'une MICI qu'à son évolution.

#### 3.3.1 CRP sérique

La CRP est une protéine quasi-exclusivement synthétisée par le foie sous la stimulation d'Il-6, de TNF $\alpha$  ou d'Il-1 $\beta$  produits par un site inflammatoire [VERMEIRE *et al.* 2004]. La CRP sérique est donc un marqueur non spécifique de l'inflammation dont la courte demi-vie d'environ 6 heures permet d'en faire un biomarqueur pour le suivi de l'inflammation. La CRP sérique est corrélée à l'activité inflammatoire de la maladie dans les MICI, évaluée avec des critères cliniques, endoscopiques ou radiologiques [LANGHORST *et al.* 2008; SOLEM *et al.* 2005; VERMEIRE *et al.* 2004]. De manière générale, l'élévation de la CRP est plus

importante dans la maladie de Crohn que dans la RCH mais cette différence n'est pas assez sensible et robuste pour en faire un marqueur de diagnostic différentiel entre la maladie de Crohn et la RCH [SAVERYMUTTU *et al.* 1986; SOLEM *et al.* 2005].

Biomarqueur	Fluide biologique	Spécificité	Intérêts
ASCA	Sérum	<u>Maladie de Crohn</u> : 39 % - 79 % de patients positifs <u>RCH</u> : 5 % - 15 % de patients positifs [PEYRIN-BIROULET <i>et al.</i> 2007; REUMAUX <i>et al.</i> 2003; SANDBORN <i>et al.</i> 2001]	Diagnostic (intérêt limité, 14 % - 18 % des individus sains sont positifs) [BERNSTEIN <i>et al.</i> 2011]
pANCA	Sérum	<u>Maladie de Crohn</u> : 2 % - 28 % de patients positifs <u>RCH</u> : 20 % - 85 % de patients positifs [PEETERS <i>et al.</i> 2001; PEYRIN-BIROULET <i>et al.</i> 2007; SANDBORN <i>et al.</i> 2001]	Diagnostic (intérêt limité, 32 % des individus sains sont positifs) [BERNSTEIN <i>et al.</i> 2011]
CRP	Sérum	Biomarqueur de l'inflammation aiguë	Evaluation de l'activité de la maladie [BURRI & BEGLINGER 2011; SAVERYMUTTU <i>et al.</i> 1986; SOLEM <i>et al.</i> 2005]
Calprotectine	Fèces	Biomarqueur de l'inflammation intestinale [LEWIS 2011; MENDOZA & ABREU 2009; VERMEIRE <i>et al.</i> 2006]	Evaluation de l'activité de la maladie [MENDOZA & ABREU 2009]
Lactoferrine	Fèces	Biomarqueur pour différencier une MICI active d'une MICI en rémission et d'un syndrome du côlon irritable [SCHOEPFER <i>et al.</i> 2008]	Diagnostic Evaluation de l'activité de la maladie [SCHOEPFER <i>et al.</i> 2008]

Source : adapté de [BENNIKE *et al.* 2014]

**TABLEAU 5. Principaux biomarqueurs biologiques utilisés dans les MICI**

### 3.3.2 Protéines fécales : lactoferrine et calprotectine

Les fèces étant en contact direct avec la paroi inflammatoire de l'intestin, cela en fait un milieu de choix pour la recherche de marqueurs potentiels de l'inflammation, tels que la calprotectine et la lactoferrine [VERMEIRE *et al.* 2006]. Ces deux protéines proviennent des cellules épithéliales ou sanguines mortes et sont éliminées dans les selles.

➤ *Calprotectine*

La calprotectine, protéine de 36 kDa liant le calcium et le zinc, est présente de manière abondante dans le cytosol des monocytes et des polynucléaires neutrophiles, dont elle représente 5 % des protéines totales et jusqu'à 60 % des protéines cytosoliques [LEWIS 2011; VERMEIRE *et al.* 2006]. La calprotectine fécale représente une mesure indirecte de l'infiltrat de polynucléaires neutrophiles présents dans la muqueuse intestinale [LEWIS 2011]. Son dosage sert principalement au diagnostic différentiel avec des pathologies digestives non inflammatoires telles que le syndrome de l'intestin irritable. Une méta-analyse incluant 30 études et 1210 patients ayant une MICI, a montré que le dosage de la calprotectine fécale était un bon marqueur diagnostique des MICI avec une sensibilité de 98 % et une spécificité de 91 %, en prenant un seuil de 100 µg/g de fèces [VON ROON *et al.* 2007]. Ces performances sont très probablement à relativiser étant donné qu'elles proviennent de multiples études hétérogènes. De plus, la spécificité de ce test pour diagnostiquer une MICI semble relativement moins élevée chez les enfants, de l'ordre de 76 % [VAN RHEENEN *et al.* 2010]. Par ailleurs, la calprotectine fécale est bien corrélée avec l'activité histologique et endoscopique des MICI [LEWIS 2011].

➤ *Lactoferrine*

La lactoferrine, glycoprotéine liant le fer, est un composant majeur des granules secondaires des polynucléaires neutrophiles – cellules principales de l'inflammation en phase aiguë – sécrété par les muqueuses [LANGHORST *et al.* 2008]. Elle présente des performances relativement comparables à la calprotectine pour le diagnostic d'une MICI bien qu'une méta-analyse incluant 1001 patients rapporte une sensibilité et spécificité de l'ordre de 80 % [GISBERT *et al.* 2009; LANGHORST *et al.* 2008; LEWIS 2011]. Tout comme la calprotectine, la lactoferrine fécale est bien corrélée à l'activité des MICI [LEWIS 2011].

### 3.3.3 Anticorps sériques : ASCA et pANCA

Les deux principaux anticorps étudiés dans les MICI sont les anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) et les anticorps, à fixation périnucléaire, anti-

cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (*perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*, pANCA).

➤ ASCA

Les ASCA sont des anticorps ayant une affinité pour la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans la maladie de Crohn, ces anticorps sont retrouvés chez 40-80 % des patients avec des titres sériques élevés, alors qu'ils sont présents que chez 5-15 % des patients ayant une RCH [LEWIS 2011; PEYRIN-BIROULET *et al.* 2007; RUEMMELE *et al.* 1998]. Cependant une part non négligeable d'individus sains sont également positifs pour les ASCA ce qui rend impossible leur utilisation pour un diagnostic de la maladie de Crohn mais restreint leur usage uniquement au diagnostic différentiel avec la RCH.

➤ pANCA

Les pANCA sont des auto-anticorps réagissant avec des constituants des granules des polynucléaires neutrophiles (anti-myéloperoxydase, anti-protéinase 3). Ces anticorps sont présents dans de nombreux dysfonctionnements immunitaires tels que les vascularites, la granulomatose de Wegener ou la polyarthrite rhumatoïde. La majeure partie des patients ayant une RCH possèdent des pANCA positifs contrairement aux patients ayant une maladie de Crohn [RUEMMELE *et al.* 1998]. Ceci étant, tout comme pour les ASCA, les pANCA ne sont pas spécifiques et sont retrouvés chez des individus sains, ne permettant pas d'en faire un test diagnostique pour les MICI [LEWIS 2011]. Les pANCA, tout comme les ASCA ne semblent pas être fortement corrélés avec l'activité ou les complications de la maladie, même si, selon certaines études, des titres plus élevés d'anticorps sont présents chez des patients non répondeurs [LEWIS 2011; RUEMMELE *et al.* 1998].

# Lignées cellulaires lymphoblastoïdes

---

Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) constituent un outil novateur et à fort potentiel pour la recherche en génomique et en pharmacogénomique. C'est un modèle expérimental *in vitro* pour des études de relation génotype-phénotype, notamment pour l'identification de facteurs génétiques, associés à des variations d'ARNm, influençant la réponse aux médicaments. Elles permettent la génération de données transcriptomiques en lien avec les effets biologiques des molécules testées ou pour le criblage de molécules ayant un mode d'action indéterminé.

## 1 Historique

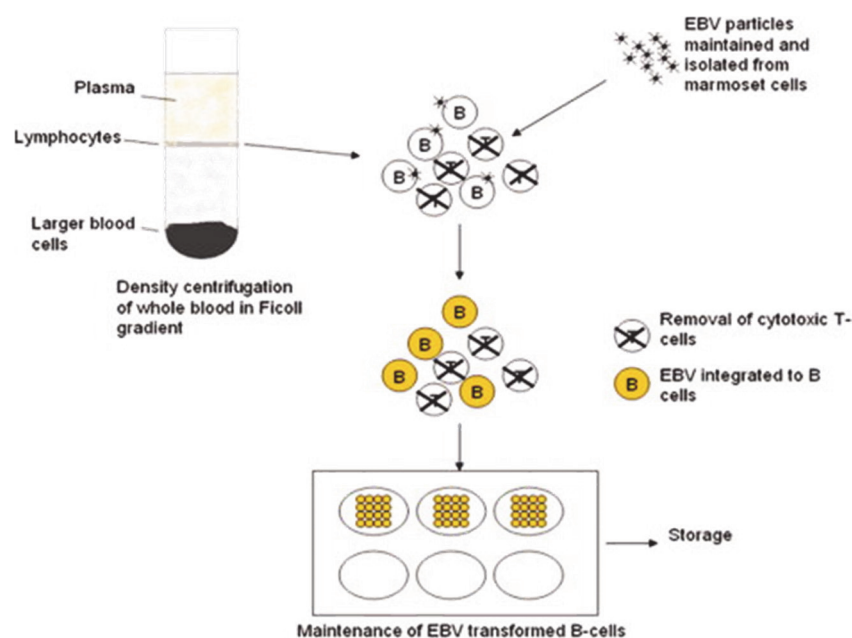
Historiquement, les LCL étaient utilisées comme moyen de conservation et de stockage d'une quantité illimitée d'ADN de patients [CARL *et al.* 2000; SIE *et al.* 2009]. Elles permettaient d'éviter de multiples prélèvements sanguins chez un même patient. Les LCL étaient donc obtenues à partir de patients provenant de populations cliniquement homogènes et bien caractérisées. Elles permettaient notamment d'étudier des voies métaboliques associées aux pathologies des patients dont elles étaient issues. Des LCL ont ainsi été constituées, par exemple, à partir de patients ayant un cancer ORL ou une sclérose en plaques [CLOOS *et al.* 1999; GIPPS & KIDSON 1984]. A l'époque de « l'ère pré-génomique », *i.e.* avant le séquençage du génome humain, elles étaient également utilisées dans des recherches en pharmacogénétique avec une approche gène-candidat [WELSH *et al.* 2009]. Ainsi, des LCL provenant de patients pédiatriques ayant une prédisposition génétique au néphroblastome ont une sensibilité augmentée à la mitomycine C, indiquant probablement un rôle de cette composante génétique dans la réponse à ce médicament [IMRAY *et al.* 1984].

En 2003, l'achèvement du séquençage du génome humain, dont une première séquence brute a été publiée en 2001, annonce l'ouverture de « l'ère génomique » actuelle [COLLINS *et al.* 2003; LANDER *et al.* 2001]. L'étude du génome entier permet une évaluation plus

complète et plus intégrée de l'ensemble des variations génétiques et leur rôle dans diverses pathologies ou dans la réponse à des médicaments. Les LCL constituent ainsi un modèle de choix, aussi bien en génomique qu'en pharmacogénomique pour l'étude de voies métaboliques. Enfin, les LCL ont également ont été très abondamment utilisées dans le cadre de l'étude des différences génétiques entre les diverses populations humaines.

## 2 Caractéristiques biologiques des lignées cellulaires lymphoblastoïdes

Les LCL sont obtenues à partir de lymphocytes B circulants transformés *in vitro* par une infection à Epstein-Barr virus (EBV) [FRISAN *et al.* 2001]. L'EBV, découvert par Epstein et Barr en 1964 dans des cellules de lymphome de Burkitt provenant de patients d'Afrique de l'Est infectés par le paludisme, est notamment connu pour être à l'origine de la mononucléose infectieuse, de lymphomes et de cancers épithéliaux [EPSTEIN & BARR 1964; MIDDELDORP *et al.* 2003].



Source: [SIE *et al.* 2009]

**FIGURE 12. Génération de lignées cellulaires lymphoblastoïdes**

Représentation schématique de la transformation de lymphocytes B périphériques en LCL à l'aide de l'EBV.



Un volume de sang d'environ 5 mL est nécessaire pour isoler les lymphocytes périphériques et les transformer en LCL en 4 à 6 semaines selon un protocole bien établi (FIGURE 12) [FRISAN *et al.* 2001]. Les LCL ainsi générées intègrent un nombre variable de copies du génome viral. Une lignée particulière, appelée Namalwa du nom de l'individu dont elle est issue, est utilisée dans différentes études comme échantillon calibrateur pour réaliser des quantifications relatives du nombre de copies d'ADN de l'EBV intégrées à la cellule : une quantification absolue par hybridation *in situ* en fluorescence a permis de déterminer que cette lignée a intégré deux copies du génome viral [CALISKAN *et al.* 2011; LAWRENCE *et al.* 1988].

Les LCL expriment de façon latente des gènes viraux tels que *EBNA1*, *EBNA2*, *EBNA3a*, *EBNA3c* et *LMP1* [NAM *et al.* 2011]. *LMP1* (EBV *latent membrane protein 1*) est un oncogène entraînant une activation des lymphocytes B et le maintien d'une prolifération continue des LCL en activant des processus cellulaires liés à l'apoptose ou au cycle cellulaire tels que les voies de signalisation du TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, p38/MAPK ou encore JAK-STAT ; *EBNA2* et *EBNA3* (EBV *nuclear antigen 2, 3*) régulent des cibles de la cellule hôte tels que TNF- $\alpha$ , G-CSF, cycline D2, c-Myc ou Il-16 [JEON *et al.* 2008; MEI *et al.* 2006; WANG *et al.* 1990; ZHANG *et al.* 2004]. Par ailleurs, l'intégrité de l'ensemble du génome des cellules primaires semble conservée après infection, à l'exception d'une augmentation du nombre de copies du segment 1p36.33, dont la séquence est quasiment identique à celle d'une partie de l'ADN mitochondrial [JEON *et al.* 2007]. Associées à une augmentation de l'expression des gènes mitochondriaux d'environ 2 fois, ces altérations correspondent à une augmentation de nombre de copies d'ADNmt pouvant refléter l'activité mitochondriale dans ces cellules par rapport aux cellules originelles [JEON *et al.* 2007].

Une fois transformée par l'EBV, ces cellules en suspension peuvent être conservées en ampoule dans l'azote liquide puis cultivées très simplement, avec ajout de milieu frais 3 fois par semaine [MORAG *et al.* 2010; SIE *et al.* 2009]. Leur phénotype est considéré stable et non oncogénique pendant une durée de 2-3 mois après décongélation d'une ampoule. Au-delà d'une quarantaine de « passages » environ, une « crise cellulaire » se produit entraînant la mort cellulaire [JEON *et al.* 2009]. Au contraire, si une lignée parvient à surpasser cette « crise cellulaire » par des mécanismes tels que l'activation d'oncogènes, l'activation des télomérases ou encore d'une aneuploïdie, elle accède alors à une immortalisation terminale [JEON *et al.* 2009; LEE *et al.* 2010; NAM *et al.* 2011]. Cela se

produit probablement grâce à une activité virale persistante à l'origine d'une augmentation du nombre de copies d'ADN viral et de l'expression des gènes de l'EBV, entraînant une transactivation des gènes hôtes par les gènes viraux [JEON *et al.* 2009]. Ces LCL immortalisées (appelées *terminally immortalized LCL*, *tLCL*) possèdent un phénotype différent des lignées non immortalisées (appelées *early passage LCL*, *eLCL*), notamment en termes de prolifération cellulaire. Ce phénotype est associé à des modifications génétiques et épigénétiques (méthylation) importantes [LEE *et al.* 2010; OH *et al.* 2013].

### 3 Banques de lignées cellulaires lymphoblastoïdes

Les banques de LCL sont principalement constituées à partir de lymphocytes provenant de dons du sang obtenus à partir d'individus sains. Elles permettent d'appréhender la diversité génétique dans son ensemble afin de cartographier les variations fréquentes (SNP) du génome humain. Elles rendent possibles des recherches sur des gènes associés aux pathologies humaines ou à la réponse aux médicaments et à l'environnement. Historiquement, la plus ancienne banque de LCL est le *Human Genome Diversity Panel* (HGDP) du Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain (CEPH) hébergée à l'Hôpital Saint-Louis à Paris, France ([www.cephb.fr/hgdp\\_panel.php](http://www.cephb.fr/hgdp_panel.php)). Elle est composée de 1063 LCL correspondant à 1048 individus issus de 52 populations réparties dans le monde entier [CANN *et al.* 2002]. Elle est utilisée dans le cadre de recherches internationales menées par plus d'une centaine de collaborateurs, pour mieux appréhender de nombreuses questions relatives à la génétique des populations, l'histoire des populations humaines modernes ainsi que celle de la diversité de leur génome. Ainsi, le CEPH, fondé par le Professeur Jean Dausset en 1984, a été à l'origine du programme de cartographie génétique en 1990 et de la première carte physique du génome humain en 1993 [COHEN *et al.* 1993; DAUSSET *et al.* 1990]. Ce modèle innovant de collaboration internationale initiée par le CEPH a été ensuite repris dans le cadre de projets internationaux tels que le séquençage du génome humain, les programmes HapMap et « 1000 génomes » [CONSORTIUM 2010; INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003]. Plus récemment en 2010, le CEPH a pris place dans le projet « *International Cancer Genome Consortium* » dont le but est de coordonner les études génomiques dans les tumeurs à partir de plus de 25 000

échantillons provenant de plus de 50 types de cancers différents à travers le monde  
[INTERNATIONAL CANCER GENOME CONSORTIUM *et al.* 2010].

Biobanque de LCL	Pays	Nb d'échantillons	Site internet
Human genome Diversity Cell Line Panel (HGDP) CEPH à l'Hôpital Saint-Louis, Paris	France	n=1063 (52 ethnies différentes)	<a href="http://www.cephb.fr/hgdp_panel.php">www.cephb.fr/hgdp_panel.php</a>
Biosample Repository Facility (BRF) Fox Chase Cancer Center, Philadelphia	Etats-Unis	n=2822	<a href="http://www.fccc.edu/research/facilities/geneticResearch/biosampleRepository/about/index.html">www.fccc.edu/research/facilities/geneticResearch/biosampleRepository/about/index.html</a>
National Cell Repository for Alzheimer's Disease (NCRAD) Indiana University	Etats-Unis	N/A	<a href="http://ncrad.iu.edu">ncrad.iu.edu</a>
Coriell Cell Repositories (CCR) Coriell Institute for Medical Research	Etats-Unis	N/A	<a href="http://ccr.coriell.org">ccr.coriell.org</a>
International Histocompatibility Working Group (IHWG) Cell and DNA Bank Seattle	Etats-Unis	n>1000	<a href="http://www.ihwg.org/index.html">www.ihwg.org/index.html</a>
Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) pan-European collaboration	Europe	N/A	<a href="http://bbmri-eric.eu">bbmri-eric.eu</a>
National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations (NLGIP) Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University	Israël	n=1673	<a href="http://www.tau.ac.il/medicine/NLGIP/catalog.htm">www.tau.ac.il/medicine/NLGIP/catalog.htm</a>
Genetic Repositories Australia (GRA) Prince of Wales Medical Research Institute in Sydney	Australie	n=361	<a href="http://www.neura.edu.au/GRA">www.neura.edu.au/GRA</a>
National University of Health (NUH) Tissue Repository Singapore	Singapour	N/A	<a href="http://medicine.nus.edu.sg/tissue/services.htm">medicine.nus.edu.sg/tissue/services.htm</a>
Taiwan Han Chinese Cell and Genome Bank Academia Sinica Institute of Biomedical Sciences	Taïwan	N/A	<a href="http://trc.ibms.sinica.edu.tw/trc">trc.ibms.sinica.edu.tw/trc</a>
BioBank Japan (BBJ)	Japon	N/A	<a href="http://biobankjp.org">biobankjp.org</a>
HapMap project	Monde	n=270 LCL de 3 ethnies (Yorubas d'Ibadan, au Nigeria ; japonais de Tokyo ; chinois Han de Beijing) Echantillons du CEPH	<a href="http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/about/hapmap.html">hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/about/hapmap.html</a> <a href="http://www.genome.gov/10005336">www.genome.gov/10005336</a>
National Biobank of Korea (NBK) Seoul	Corée du Sud	n=10038	[NAM <i>et al.</i> 2011]

Source : adapté de [SIE *et al.* 2009]

**TABLEAU 6. Biobanques de lignées cellulaires lymphoblastoïdes à travers le monde**

La banque de LCL du CEPH, ainsi que celle constituée par le projet de HapMap (carte des haplotypes du génome humain), sont constituées d'échantillons provenant d'individus de diverses populations humaines dans le but de mieux appréhender la diversité inter-ethnique [CANN *et al.* 2002; INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003]. Elles permettent également de réaliser des recherches phylogénétiques en lien avec les évolutions géographiques de l'espèce humaine grâce à la définition d'haplotypes caractéristiques. Il existe maintenant de multiples banques de LCL, constituées à partir d'individus sains, qui ont été développées dans différents pays comme Israël, le Japon ou encore la Corée du Sud (Tableau 6).

Enfin, d'un point de vue moins philanthropique, une société américaine 23andMe exploite de manière commerciale ces informations sur les haplotypes « géographiques » en proposant d'établir les origines ethno-géographiques d'un individu grâce à un prélèvement d'ADN ([www.23andme.com/ancestry](http://www.23andme.com/ancestry)). Jusqu'à une récente suspension d'activité ordonnée par la FDA, 23andMe proposait également le géotypage d'un très grand nombre de SNP permettant de prédire, sans l'intervention d'un médecin, le risque de survenue de nombreuses maladies ou d'effets indésirables à des médicaments [ANNAS & ELIAS 2014; BAUDHUIN 2014].

## 4 Applications en recherche

Les LCL présentent un intérêt grandissant pour les études en génomique [STARK & DOLAN 2013; WHEELER & DOLAN 2012]. En effet, ces lignées cellulaires englobent un très grand nombre de voies métaboliques qui sont spécifiques des individus à partir desquels elles ont été générées, permettant de combiner des études moléculaires à des analyses fonctionnelles [AMOLI *et al.* 2008]. Ainsi, grâce à ce modèle, l'impact phénotypique de variations génétiques chez des individus sains, ou chez des patients, peut être mis en évidence à l'aide d'études fonctionnelles et en réalisant des corrélations génotype/phénotype [SIE *et al.* 2009]. De même, des régulations transcriptionnelles peuvent être étudiées de façon dynamique (par exemple suite à un traitement), en fonction du génotype des individus.

Les LCL représentent un modèle cellulaire largement utilisé pour la recherche de biomarqueurs en pharmacogénomique. A l'aide d'un test phénotypique de mesure de la sensibilité relative à une molécule donnée, il est possible d'identifier des biomarqueurs associés à des différences inter-individuelles de sensibilité vis-à-vis de cette molécule. Les modèles expérimentaux utilisant des LCL et fondés sur l'utilisation de puces transcriptomiques permettent de mettre en évidence des profils d'expression impliqués dans la sensibilité ou la résistance à un médicament [CLOOS *et al.* 2006]. Cette approche transcriptomique par puce pangénomique permet aussi l'identification de voies de signalisation ou de nouveaux mécanismes d'action liés à un médicament donné. L'analyse globale de données transcriptomiques combinée à une étude d'association sur génome entier (GWAS) permet la caractérisation de régions génomiques régulant l'expression d'un gène donné, dont le caractère héréditaire a été démontré, appelées *expression quantitative trait loci* (eQTL) [MORLEY *et al.* 2004]. Ces eQTL, *i.e.* SNP régulant l'expression d'autres séquences génétiques, peuvent potentiellement avoir une importance dans la modulation de gènes d'intérêt en pharmacogénétique et représenter des « marqueurs » génétiques de la réponse aux médicaments [WELSH *et al.* 2009].

L'analyse de l'expression des gènes requiert toutefois certaines précautions car des différences dans le niveau d'expression des gènes, tout comme pour l'épissage alternatif, peuvent refléter des variations tissu et/ou cellule dépendantes. Cependant, une grande part du transcriptome est commune à de nombreux types cellulaires et on estime que l'on

retrouve environ la moitié des transcrits issus du génome humain dans les LCL, permettant l'analyse de nombreuses voies biologiques présentant un intérêt potentiel [CHEUNG *et al.* 2003; SIE *et al.* 2009; ZHANG *et al.* 2008]. Ainsi, à titre d'exemple, des profils transcriptomiques ont ainsi pu être établis à partir de LCL pour des pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) ou psychiatriques (autisme, dépression) puis validés ensuite dans des études ultérieures [ABE *et al.* 1991; HU *et al.* 2006; KOBAYASHI *et al.* 2003; MORAG *et al.* 2011]. Les LCL sont également une source de matériel biologique pour des études protéomiques par spectrométrie de masse, nécessitant une quantité importante de protéines, difficilement obtenue à partir d'échantillons tissulaires ou cellulaires directement prélevés chez des patients [XIE *et al.* 2005]. Enfin, les LCL peuvent également être utilisées pour réaliser des études sur puces à western-blot (*microwestern arrays*), qui représentent la dernière innovation technologique, très prometteuse, en vue de l'analyse du protéome à grande échelle [CIACCIO *et al.* 2010; STARK & DOLAN 2013].

Molécule étudiée	Mécanisme d'action	Classe thérapeutique	Banque de LCL	Type d'analyse	Référence
Paroxétine	Inhibiteur de recapture de la sérotonine	Antidépresseur	NLGIP	Transcriptomique	[MORAG <i>et al.</i> 2011]
Radiothérapie	--	Anticancéreux	Corriell	GWAS et transcriptomique	[NIU <i>et al.</i> 2010]
Panel de 29 médicaments	--	Anticancéreux	CAP clinical trial	GWAS	[BROWN <i>et al.</i> 2014]
Clofarabine	Analogue des nucléosides puriques	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS, protéomique, épigénome	[EADON <i>et al.</i> 2013]
Tamoxifène	Anti-estrogène	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS et transcriptomique	[WENG <i>et al.</i> 2013]
Isoliquiritigénine	Induction de l'apoptose	Anticancéreux (en développement)	National Biobank of Korea	Transcriptomique	[LEE <i>et al.</i> 2012b]
Gemcitabine et cytarabine	Analogue de la cytidine	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS et transcriptomique	[LI <i>et al.</i> 2008, 2009, 2014]
Etoposide	Inhibiteur de la topoisomerase II	Anticancéreux	CEPH et HapMap	GWAS et transcriptomique	[HUANG <i>et al.</i> 2007]
Cytarabine	Analogue de la cytidine	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS et transcriptomique	[HARTFORD <i>et al.</i> 2009]
Carboplatine	Alkylant de l'ADN	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS et transcriptomique	[HUANG <i>et al.</i> 2008]
Carboplatine et cisplatine	Alkylant de l'ADN	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS	[WHEELER <i>et al.</i> 2013]
Cisplatine et paclitaxel	Alkylant de l'ADN et poison du fuseau	Anticancéreux	HapMap (Corriell)	GWAS et protéomique	[STARK <i>et al.</i> 2014]
Gemcitabine, cytarabine, 6-TG, 6-MP	Analogue des bases pyrimidiniques et des puriques	Anticancéreux et immunosuppresseur	Corriell	Transcriptomique	[FRIDLEY <i>et al.</i> 2011]
6-thioguanine et 6-mercaptopurine	Analogue des bases puriques	Anticancéreux et immunosuppresseur	Corriell	GWAS et transcriptomique	[MATIMBA <i>et al.</i> 2014]
Sirolimus et everolimus	Inhibiteur de la mTOR	Immunosuppresseur	Corriell	GWAS et transcriptomique	[JIANG <i>et al.</i> 2013]
Acide mycophénolique	Inhibiteur de l'IMDPH	Immunosuppresseur	Corriell	Transcriptomique	[WU <i>et al.</i> 2011]
Simvastatine	Inhibiteur de l'HMG-CoA reductase	Hypolipémiant	CAP clinical trial	Protéomique	[MEDINA <i>et al.</i> 2012]

TABLEAU 7. Exemples d'études de pharmacogénomique réalisées *in vitro* à l'aide de lignées cellulaires lymphoblastoïdes

## 5 Modèle pharmacogénomique *in vitro*

### 5.1 Caractéristiques et intérêts

La sensibilité relative d'une LCL à un médicament est définie en termes d'inhibition de la prolifération cellulaire suite à un traitement pendant 72 heures [MORAG *et al.* 2010; STARK *et al.* 2010]. La détermination de cette inhibition, par comparaison à un groupe contrôle, est fondée sur la mesure de la viabilité cellulaire effectuée au terme des 72 heures de traitement [WANG *et al.* 1996]. Cette dernière est évaluée grâce à une simple réaction colorimétrique avec un dérivé du formazan dont la transformation en formazan est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Techniquement, les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits puis incubées en présence d'un médicament donné pendant 72 heures. A ce terme, l'ajout dans le milieu d'un colorant à base de sel de tétrazolium (par exemple : MTS, XTT...), qui sera réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, va entraîner une coloration du milieu cellulaire. Enfin, la mesure de l'absorbance à 490nm dans des cellules traitées et dans des cellules contrôles non traitées permet de calculer le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire induite par le traitement. La sensibilité d'une LCL varie en fonction du traitement étudié. Par ailleurs, pour une même LCL, on observe un profil de sensibilité identique vis-à-vis de molécules partageant le même mécanisme d'action [MORAG *et al.* 2010]. Par conséquent, il est possible d'utiliser ce modèle cellulaire pour un criblage à haut-débit lors du développement de nouvelles molécules, notamment à visée thérapeutique.

A partir du pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire obtenu pour une molécule d'intérêt, il est possible de classer un panel de LCL en fonction de leurs sensibilités relatives à cette molécule. Ainsi, la comparaison des caractéristiques, notamment « omiques » (génomiques, transcriptomiques, protéomiques...), de deux groupes de LCL sélectionnées pour leur phénotype extrême, *i.e.* sensible ou résistant, vis-à-vis d'une molécule donnée peut participer à la compréhension des mécanismes moléculaires associés à ces phénotypes opposés [MORAG *et al.* 2010, 2011] (TABLEAU 7).



## 5.2 Limites du modèle

Ce modèle nécessite une inhibition de la prolifération cellulaire induite par un médicament ou une petite molécule. Il n'est donc pas applicable aux médicaments n'ayant pas ou peu d'effet sur la prolifération cellulaire comme, par exemple, les antagonistes muscariniques [MORAG *et al.* 2010]. De plus, des facteurs confondants peuvent interférer avec le phénotype observé, *i.e.* inhibition de la prolifération cellulaire, et donc induire des interprétations erronées des résultats issus des analyses transcriptomiques. Ainsi, Choy *et al.* ont mis en évidence l'existence de problèmes de répétabilité du phénotype et sa corrélation avec des facteurs confondants tels que le taux de réplication basale des cellules, la concentration intracellulaire en ATP ainsi que le nombre de copies intégrées du génome d'EBV [CHOY *et al.* 2008]. Ces variations « non-génétiques » peuvent survenir lors de la phase de transformation des lymphocytes circulant par EBV ou lors de modifications des conditions de culture. En effet des études *in vitro* portant sur des kératinocytes et des lymphomes à cellules B ont montré que l'infection à EBV modifie les voies de l'apoptose en réponse à certains cytostatiques [FENG *et al.* 2004; LIU *et al.* 2004]. Ainsi les effets de l'EBV semblent dépendants du type cellulaire et des médicaments étudiés. De plus, des mutations non germinales ont aussi été trouvées dans les LCL telles que des variations du nombre de copies d'ADN mitochondrial [JEON *et al.* 2007]. Tous ces facteurs précités pourraient ainsi perturber les associations entre les variations génétiques d'une lignée, reflétant celles d'un individu à l'origine de la lignée, et le phénotype observé, pouvant constituer une source de variabilité non négligeable. Ces facteurs de variabilité sont à prendre en compte dans l'interprétation des résultats afin de réduire le risque d'associations aléatoires et réduire ainsi la puissance du modèle. Ces facteurs confondants n'ont pas été retrouvés dans une étude ultérieure à celle de Choy *et al.*, à l'exception du taux de réplication basale des cellules qui était associé à la sensibilité vis-à-vis de médicaments cytotoxiques [STARK *et al.* 2010; WELSH *et al.* 2009]. Il n'est en effet pas surprenant que la sensibilité à des anticancéreux soit en partie dépendante du taux de réplication basale des cellules [HARTFORD *et al.* 2009; HUANG *et al.* 2008]. De nombreux anticancéreux ont été conçus pour exercer un effet cytotoxique sur les cellules tumorales proliférant rapidement [ELION 1989]. Ainsi, les variants génétiques associés à la réponse à des anticancéreux sont, au moins en partie, liés à la prolifération cellulaire, bien que la principale part de variabilité de cette réponse soit expliquée par des facteurs

génétiques reliés au résultat de l'analyse de profils d'expression de gènes [CHEUNG *et al.* 2003].

A ce jour, les anticancéreux et les immunosuppresseurs sont les molécules les plus étudiées avec le modèle des LCL avec notamment des analogues des pyrimidines ou des purines [FRIDLEY *et al.* 2011; LI *et al.* 2008, 2009], l'isoliquritigénine [LEE *et al.* 2012b], l'acide mycophénolique [WU *et al.* 2011], ou encore un panel d'anticancéreux [BROWN *et al.* 2014] (TABLEAU 7). Des recherches sont encore nécessaires pour préciser, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la part relative de la prolifération cellulaire dans la réponse à ces molécules.

La connaissance du modèle et de ses limites permet d'envisager diverses stratégies pour diminuer les sources de variabilité et les risques d'interprétation erronée des résultats.

Les limites de ce modèle peuvent être appréhendées par diverses manières. D'une part, en utilisant des LCL provenant d'un laboratoire unique qui immortalise les lymphocytes dans les mêmes conditions à partir de la même souche d'EBV [MORAG *et al.* 2010]. D'autre part, la répétition de la mesure des phénotypes présentant une bonne reproductibilité est un gage de fiabilité des mesures. Par ailleurs, la détermination des différents facteurs confondants évoqués précédemment, dont l'importance relative dépend des molécules étudiées, doit permettre de les prendre en compte dans les analyses. Les tests d'inhibition de la prolifération doivent également être effectués dans les 2 à 4 mois après décongélation d'une ampoule, afin d'éviter une immortalisation totale de la lignée cellulaire à l'origine de modifications phénotypiques pouvant influencer la sensibilité au traitement [JEON *et al.* 2009; SAWADA *et al.* 2005]. Enfin, même si les LCL ont été utilisées abondamment en pharmacogénomique pour leur réplique fidèle du génome et de l'épigénome des donneurs correspondants, il s'agit toutefois d'un modèle expérimental, et la sensibilité d'une lignée à un traitement n'est pas le reflet exact de la sensibilité des lymphocytes d'un individu donné [BRENNAN *et al.* 2009; SIE *et al.* 2009].



# OBJECTIFS

---



## **Contexte**

Les thiopurines, molécules aux propriétés anti-métabolites et immunosuppressives, sont des médicaments efficaces, largement prescrits dans les MICI et dans certaines formes de leucémies. La variabilité observée dans la réponse à ces médicaments se traduit cliniquement par une résistance au traitement entraînant des rechutes cliniques et des effets indésirables potentiellement graves (toxicités hématologiques et hépatiques notamment).

Ce travail de thèse a été initié par un cas clinique de résistance pharmacologique aux thiopurines chez une patiente ayant une MICI et prise en charge à l'HEGP. Suite à cette observation clinique, nous avons entrepris d'explorer la variabilité de la réponse à ces médicaments par des approches complémentaires – cliniques et expérimentale – afin d'améliorer la connaissance des facteurs influençant la résistance ou la toxicité aux thiopurines.

## **Objectifs**

Ce travail de recherche a pour objectifs (i) une meilleure connaissance des facteurs prédictifs et des facteurs associés à la réponse aux thiopurines en vue d'une optimisation de la réponse clinique (amélioration de l'efficacité, diminution des effets indésirables), (ii) le développement d'une individualisation thérapeutique fondée sur des stratégies pharmacogénétiques et (iii) l'identification de nouveaux facteurs pharmacogénomiques prédictifs de la réponse aux thiopurines. Ce travail s'est particulièrement intéressé à la résistance aux thiopurines. Pour cela nous avons utilisé, en parallèle, deux types d'approches complémentaires : cliniques et *in vitro*.

## **Axes de recherche**

### **(i) Axe de recherche clinique**

Cet axe de recherche clinique comporte des travaux de recherche (a) *in silico*, réalisés à partir de bases de données, et (b) *in vivo*, avec une étude clinique rétrospective.

#### **a. Approches *in silico***

Un premier travail de recherche a été la constitution puis l'analyse d'une base de données pharmacogénétiques sur les thiopurines à partir des résultats issus de 10 années

d'activité hospitalière de pharmacogénétique relative aux thiopurines à l'HEGP. Cela nous a permis d'analyser les relations entre l'activité et le génotype TPMT, ainsi que la production des métabolites des thiopurines au cours du STP en lien avec les autres variables.

Un second travail de recherche, fondé sur une exploitation des dossiers patients informatisés, s'est focalisé sur les patients ayant une MICI et pris en charge par le Service de Gastroentérologie de l'HEGP. Nous avons notamment étudié, à partir de l'entrepôt de données cliniques de cet hôpital et à l'aide d'une méthodologie novatrice (*Phenome-wide association study*, PheWAS), les conséquences d'une activité TPMT très élevée sur l'évolution clinique et biologique des patients au cours d'un traitement par thiopurine.

b. Approche *in vivo*

Ce travail est constitué par une étude clinique rétrospective (protocole REFAZAME) sur une série de patients ayant une MICI, traités par thiopurine dans le service de Gastroentérologie pédiatrique de l'Hôpital Necker-Enfants Malades, et ayant eu une détermination d'activité TPMT et/ou un STP. Ces patients ont été identifiés grâce à notre base de données pharmacogénétiques. L'objectif de ce travail est la caractérisation de la réponse aux thiopurines dans une population pédiatrique de taille importante ainsi que l'identification de facteurs clinico-biologiques associés ou prédictifs de l'efficacité et/ou des toxicités aux thiopurines. Enfin, ce travail devrait permettre la réalisation d'un algorithme permettant la définition d'une posologie optimale en azathioprine chez ces patients pédiatriques. Cette étude clinique qui a été conçue, mise en place puis réalisée durant cette thèse, est encore en cours d'analyse et les résultats ne sont pas finalisés.

(ii) Axe de recherche *in vitro*

Ce travail expérimental visait à identifier des facteurs génétiques prédictifs de la résistance aux thiopurines. Nous avons utilisé un modèle pharmacogénomique original fondé sur des LCL, provenant d'individus sains. Après une étape de sélection de lignées sensibles et résistantes aux thiopurines, notre stratégie a comporté d'une part une caractérisation des variations des enzymes connues du métabolisme des thiopurines, et d'autre part, une analyse sans *a priori* avec la comparaison des profils transcriptomiques des lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles.

# TRAVAUX DE RECHERCHE

---





# Article 1

---

## **Absence de réponse clinique aux thiopurines dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : comment vaincre la résistance thérapeutique ?**

Laurent Chouchana <sup>1,3,4</sup>, Denis Roche <sup>1</sup>, Raymond Jian <sup>2,3</sup>, Philippe Beaune <sup>3,4</sup>, Marie-Anne Lorient <sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou. Biochimie, Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire. Paris, France

<sup>2</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou. Hépatogastro-entérologie et endoscopie digestive. Paris, France

<sup>3</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité. Paris, France

<sup>4</sup> INSERM UMR-S775. Paris, France

### **Cas clinique**

Une patiente de 24 ans présentant une rectocolite hémorragique, évoluant depuis cinq ans et corticodépendante à la dose de 20 à 40 mg/jour, a reçu de l'azathioprine à la posologie usuelle de 100 mg par jour (1,9 mg/kg/jour) pour une reprise de la symptomatologie. En raison d'une inefficacité clinique, la posologie est rapidement augmentée à 125 mg par jour (2,3 mg/kg/jour), et la patiente sera sevrée en corticoïdes trois mois plus tard. Sept mois après l'introduction de l'azathioprine, le traitement est toujours inefficace et la patiente présente une forte intolérance digestive. L'azathioprine est alors substituée par une autre thiopurine, la 6-MP à la posologie de 1,4 mg/kg/jour, qui sera mieux tolérée sur le plan digestif mais sans apporter d'amélioration clinique. La corticothérapie est alors réintroduite pour une courte période permettant une résolution rapide de la symptomatologie, malheureusement transitoire. Un dosage des métabolites thiopuriniques est alors réalisé montrant des 6-TGN très bas à 132 pmol/8x10<sup>8</sup> GR et des 6-MMPN très élevés à 11666 pmol/8x10<sup>8</sup> GR. Un second dosage trois mois plus tard confirme ces résultats avec des 6-TGN à 127 pmol/8x10<sup>8</sup> GR et des 6-MMPN à 26304

pmol/8x10<sup>8</sup> GR. A la vue de ces résultats, l'activité TPMT a été mesurée et est retrouvée très élevée à 61,5 nmol/h/8x10<sup>8</sup> GR (activité élevée [8,5-15,0 nmol/h/8x10<sup>8</sup> GR]). Devant cette inefficacité clinique et cette résistance pharmacologique, le traitement par 6-MP est arrêté et un anti-TNF $\alpha$  a été introduit, l'adalimumab, rapidement remplacé par l'infliximab, présentant une bonne efficacité clinique.

### **Analyse et discussion**

Chez cette jeune patiente de 24 ans atteinte d'une rectocolite hémorragique, 15 mois d'inefficacité thérapeutique ont entraîné des rechutes cliniques péjoratives. Un premier dosage des concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN et en 6-MMPN effectué un an après l'introduction de l'azathioprine a révélé des concentrations infra-thérapeutiques, associée à un ratio [6-MMPN:6-TGN] extrêmement élevé à 88, malgré de fortes doses de 6-MP. Ces résultats ont été confirmés par un second prélèvement trois mois plus tard. Un phénotypage de la TPMT a montré une activité inhabituelle et extrêmement élevée. Cette valeur constitue l'activité TPMT la plus haute jamais détectée par l'Unité fonctionnelle de pharmacogénétique de l'HEGP.

Même si la TPMT n'est pas le déterminant majeur du ratio métabolique, il est tout de même probable qu'une activité exceptionnelle, de plus de 4 fois la valeur de la limite normale supérieure, ait entraîné un switch du métabolisme des thiopurines en faveur des 6-MMPN [VAN EGMOND *et al.* 2012]. Par ailleurs, un ratio métabolique également très élevé est largement en faveur d'une absence de réponse thérapeutique efficace aux thiopurines [DUBINSKY *et al.* 2002].

De manière surprenante, cette patiente n'a pas développé de toxicité hépatique malgré des concentrations intra-érythrocytaires en 6-MMPN entre 2 et 4 fois supérieures au seuil de toxicité habituellement reconnu [DUBINSKY *et al.* 2000]. Cependant, plusieurs études ont également rapporté des cas de patients ayant des concentrations élevées en 6-MMPN sans développer de toxicités [GOLDENBERG *et al.* 2004; REINSHAGEN *et al.* 2007]. La durée d'exposition des patients à des concentrations « toxique » a été évoquée [DUBINSKY *et al.* 2000]. Il est également possible que d'autres facteurs, biologiques ou génétiques, soient nécessaires pour l'apparition d'une hépatite suite à des concentrations élevées en 6-MMPN.

Cette patiente aurait probablement bénéficié d'une optimisation thérapeutique avec une co-administration d'allopurinol. En effet, il a été montré par de nombreuses études cliniques que, chez les patients non-répondeurs et présentant un ratio métabolique défavorable, l'administration de 100 mg/jour d'allopurinol associé à une baisse des doses de thiopurine à 25-50 % de la posologie initiale permettait de détourner une partie de la production des métabolites 6-MMPN vers celle des 6-TGN [ANSARI *et al.* 2010; GARDINER *et al.* 2011; SPARROW *et al.* 2005, 2007]. Cette inversion permet alors d'obtenir une réponse thérapeutique, maintenue sur le long terme et sans augmentation du risque toxique [ANSARI *et al.* 2008b].

En conclusion, le dépistage *a priori* – par phénotypage ou génotypage – de cette activité TPMT extrêmement élevée, complété par un dosage intra-érythrocytaire des 6-TGN et 6-MMPN aurait probablement entraîné une contre-indication précoce des thiopurines chez cette patiente, ou un changement rapide du traitement pour un médicament d'une autre classe pharmacologique. Ce cas clinique, qui a fait l'objet d'une première publication, illustre concrètement l'intérêt de la pharmacogénétique dans la prise en charge thérapeutique des patients non répondeurs aux thiopurines.

**Article publié dans *Clinical Chemistry* (cf. pages suivantes)**

**« Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? »**

Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, Lorient MA. *Clin Chem.* 2013;59(7):1023-6.

*Impact factor : 7,1*

## Poor Response to Thiopurine in Inflammatory Bowel Disease: How to Overcome Therapeutic Resistance?

Laurent Chouchana,<sup>1,2,3</sup> Denis Roche,<sup>1</sup> Raymond Jian,<sup>2,4</sup> Philippe Beaune,<sup>1,2,3</sup> and Marie-Anne Lorient<sup>1,2,3\*</sup>

### CASE DESCRIPTION

A 24-year-old woman (53 kg) with a 5-year history of steroid-dependent ulcerative colitis with mild and extensive ulcerations presented to the gastroenterology clinic for symptom recurrence. She was given 100 mg/day ( $1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) azathioprine (AZA)<sup>5</sup> for 1 month, after which the dose was increased to 125 mg/day ( $2.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ). Four months later, the patient was tapered off steroid therapy. Her symptoms persisted after 7 months of AZA therapy, however, and she experienced gastrointestinal side effects. The patient was switched to another thiopurine drug, 6-mercaptopurine (6-MP), at 75 mg/day ( $1.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ), which was well tolerated but similarly ineffective (8 stools daily). A brief course of steroid therapy rapidly produced a substantial but short-lived clinical improvement.

To understand this patient's unresponsiveness to 2 thiopurine agents, we quantified thiopurine metabolites (1) 1 year after initiating AZA therapy. Intraerythrocyte concentrations of 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) were low ( $132 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes; therapeutic interval,  $230\text{--}400 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes), and 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMPRs) were very high ( $11\,666 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes; therapeutic interval,  $<5800 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes). A second quantification of thiopurine metabolites 3 months later confirmed these results (6-TGNs,  $127 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes; 6-MMPR,  $26\,304 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes). The patient had

### QUESTIONS TO CONSIDER

1. What is the clinical utility of assessing the TPMT phenotype or genotype?
2. What is the rationale for therapeutic drug monitoring of thiopurines?
3. What causes of resistance should be considered before switching to another drug class in patients with apparent thiopurine resistance?
4. How can thiopurine treatment be optimized in patients with a very high TPMT activity?

an unusual and extremely high thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity in erythrocytes [ $61.5 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{mL erythrocytes})^{-1}$ ; reference interval,  $8.5\text{--}15 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{mL erythrocytes})^{-1}$ ]. The lack of clinical efficacy for 6-MP, together with the evidence of pharmacologic resistance, prompted discontinuation of 6-MP therapy. Thereafter, we administered the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) antagonist adalimumab, but we quickly replaced it with infliximab, which has a good clinical efficacy and safety profile.

### DISCUSSION

The thiopurines AZA and 6-MP are cytotoxic and immunosuppressive drugs that constitute the cornerstone of maintenance therapy for inflammatory bowel disease (IBD). Both drugs cause severe hematologic toxicity (e.g., neutropenia) and hepatotoxicity in up to 10% and 13% of patients, respectively (2). Resistance to thiopurines occurs in about 40% of patients (3).

AZA and 6-MP are inactive molecules that require bioactivation via a complex enzymatic metabolism. After administration, AZA is rapidly transformed to 6-MP, which is then metabolized via 3 competitive enzymatic pathways, 2 of which are catabolic [xanthine oxidase (XO) and TPMT]. The anabolic pathway, via hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), produces active 6-TGN metabolites (Fig. 1) (2). This metabolism is largely regulated by TPMT, which catalyzes the conversion of 6-MP to 6-methylmercaptopurine (6-MMP) and related

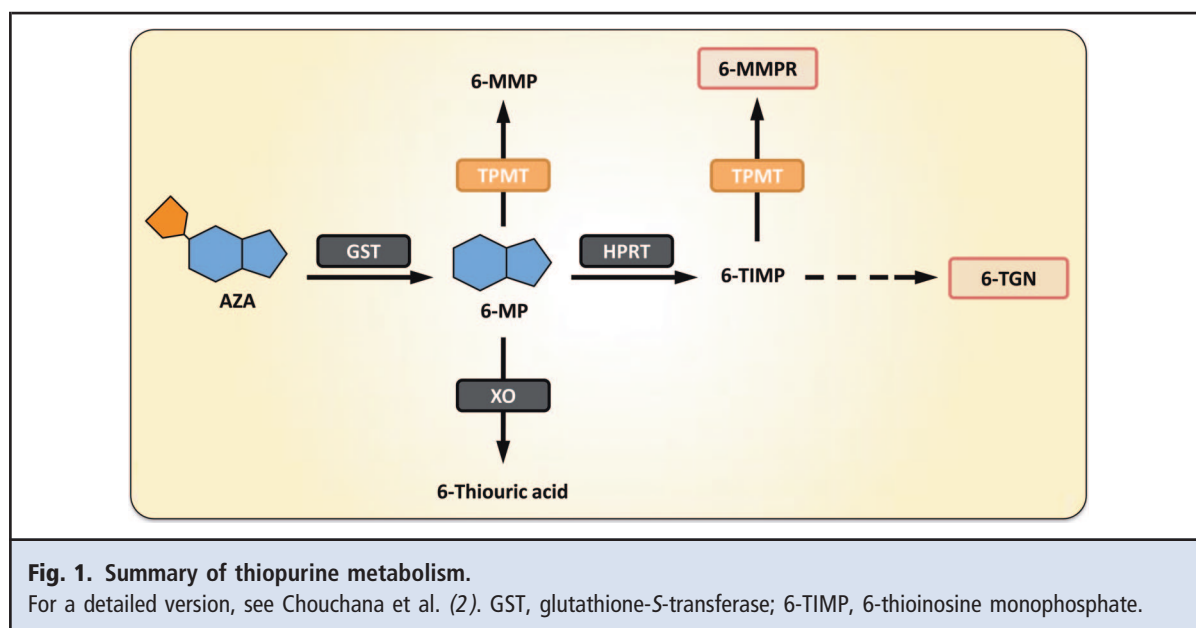
<sup>1</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochimie, Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, Paris, France; <sup>2</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>3</sup> INSERM UMR-S775, Paris, France; <sup>4</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Hepato-gastro-entérologie et endoscopie digestive, Paris, France.

\* Address correspondence to this author at: Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochimie, Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, 20 rue Leblanc, Paris, France. Fax +33-1-56-09-33-93; e-mail marie-anne.lorient@egp.aphp.fr.

Received September 4, 2012; accepted November 27, 2012.

DOI: 10.1373/clinchem.2012.195750

<sup>5</sup> Nonstandard abbreviations: AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotide; 6-MMPR, 6-methylmercaptopurine ribonucleotide; TPMT, thiopurine S-methyltransferase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IBD, inflammatory bowel disease; XO, xanthine oxidase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid.



6-MMPRs. TPMT activity varies widely across individuals, and this variation is due to genetic polymorphisms in the TPMT gene and in unrelated sequences (2). About 0.03%–0.6% of patients have low TPMT activity (homozygous mutant), approximately 3%–14% have an intermediate activity level (heterozygote), and approximately 86%–97% present a normal or high activity (homozygous wild type), with large variation occurring among ethnic groups (4). Moreover, in approximately 15% of the patients, TPMT activity is very high (over reference interval) compared to patients within the reference interval with normal/high TPMT activity (2).

TPMT activity (or genotype) is negatively correlated with the blood 6-TGN concentration, and a cutoff of approximately  $235 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  erythrocytes has been correlated with a therapeutic response (2). Thus, patients with low or intermediate TPMT activity (homozygous mutant or heterozygotes) are more likely to have toxic 6-TGN concentrations and are therefore at greater risk for neutropenia or even lethal bone marrow suppression, especially in homozygous patients (2, 3). These patients should therefore receive a lower thiopurine dosage. Conversely, patients with a very high TPMT activity have low 6-TGN concentrations, and their thiopurine metabolism preferentially produces methylated derivatives (6-MMPRs) associated with hepatotoxicity (2). The abundance of data on TPMT deficiency and hematologic toxicity contrasts with the paucity of information on thiopurine resistance. Patients with a very high TPMT activity are more prone to have low 6-TGN concentrations. Thus, standard thiopurine dosages may be inadequate, leading to thiopurine resistance with a high 6-MMPR/6-TGN ratio (3). In this situation, therapeutic drug

monitoring with measurements of 6-TGN and 6-MMPR concentrations could highlight that a thiopurine dosage above the standard range is necessary to overcome the pharmacologic resistance. Patients like the one we describe, however, have a very high TPMT activity with predominately methylated derivatives. Dosage escalation in such cases can lead to preferential 6-MMPR production, risking hepatotoxicity (3). Furthermore, dosage escalation is not consistently effective in patients with resistance to standard dosages, regardless of the TPMT activity (3). Worth noting is that an unfavorable 6-MMPR/6-TGN ratio (i.e., high 6-MMPR and low 6-TGN) has also been reported in patients with a normal TPMT activity (5, 6).

Therapeutic response can be improved in patients with increased blood 6-MMPR concentrations, which are usually related to a very high TPMT activity, by using the XO inhibitor allopurinol to potentiate 6-TGN production. The well-known interaction between thiopurines and allopurinol can cause serious adverse hematologic events, and this combination is contraindicated by the US Food and Drug Administration. Allopurinol was first used to shift the metabolism of thiopurine compounds from 6-MMP to 6-TGN in poor responders to AZA or 6-MP (7). The authors of this retrospective study, which included 20 patients who had failed to respond to AZA or 6-MP and who had high 6-MMPR concentrations, gave the patients 100 mg allopurinol daily and decreased the thiopurine dosage to 25%–50% of the original dosage. This allopurinol–thiopurine combination increased 6-TGN concentrations 2-fold and decreased 6-MMPR concentrations 5-fold (7). Clinically, this

combination seemed safe and effective, improving the clinical disease activity and diminishing the steroid requirements. In addition, adding allopurinol in patients with an aminotransferase increase during thiopurine therapy restored normal aminotransferase activities and alleviated hepatotoxicity (7).

That allopurinol improves the 6-MMPR/6-TGN ratio in vivo has been abundantly documented, but the mechanism underlying this drug–drug interaction remains unclear. Allopurinol inhibits XO but has no direct inhibiting effect on TPMT (8). An open-label prospective study of allopurinol combined with low-dose thiopurine therapy showed increased HPRT activity (9). This increase in HPRT activity, which catalyzes the first step in 6-TGN production, is consistent with the 6-TGN increase, but it does not fully explain the simultaneous dramatic decrease in 6-MMPR, which leads to an improved metabolite ratio. Finally, an in vitro study (10) suggested an alternative biochemical mechanism: XO inhibition by allopurinol may lead to preferential 6-MP oxidation via aldehyde oxidase, with the production of dihydroxy-6-MP, a compound responsible for feedback inhibition of TPMT activity.

Another approach for increasing blood 6-TGN concentrations is the combination of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) and thiopurine. An alteration in thiopurine metabolism caused by the addition of 5-ASA has been described (2). Adding 5-ASA led to an increase in the 6-TGN concentrations, probably caused by TPMT inhibition (2).

Determining the TPMT phenotype or genotype before initiating thiopurine therapy ensures the identification of TPMT-deficient patients, thereby enabling the prevention of serious adverse hematologic events. Determining the TPMT phenotype also allows identification of patients with a very high TPMT activity. Such patients are prone to thiopurine resistance and may therefore require an increased thiopurine dosage or alternative forms of treatment. A switch to 6-MP is useless in these patients. Metabolite assays are useful for dosage adjustments during thiopurine therapy. Moreover, the combination of low-dose thiopurine

#### POINTS TO REMEMBER

- Determining the TPMT phenotype or genotype is recommended to help in selecting the initial thiopurine dosage for patients scheduled for thiopurine therapy.
- Early assessment of metabolite concentrations is useful for validating the initial thiopurine dosage in patients with a very high or low TPMT activity.
- Metabolite assays can help identify underdosing, poor compliance, or an unfavorable metabolic profile in patients with thiopurine resistance.
- Thiopurine therapy can be optimized in patients with an unfavorable metabolic profile by adding 100 mg allopurinol per day to the therapy. This strategy requires lowering the thiopurine dosage to 25%–50% of baseline and monitoring blood cell counts at short intervals.

therapy and allopurinol may be helpful in patients with an unfavorable metabolite profile and pharmacologic resistance or hepatotoxicity. This therapeutic strategy requires close monitoring of blood cell counts and metabolite assays.

In conclusion, early analysis of thiopurine metabolism in patients with thiopurine resistance can help physicians optimize therapy and avoid an early switch to another drug from the limited panel of therapies available for treating inflammatory bowel disease. Close cooperation between the pharmacologist and the physician is crucial to optimize patient care and decrease the time to remission.

**Author Contributions:** All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

**Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest:** No authors declared any potential conflicts of interest.

#### References

1. Dervieux T, Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin Chem* 1998;44: 551–5.
2. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M-A, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:15–36.
3. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:904–15.
4. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:387–91.
5. Hoentjen F, Hanauer SB, de Boer NK, Rubin DT. Two brothers with skewed thiopurine metabolism in ulcerative colitis treated successfully with allopurinol and mercaptopurine dose reduction. *Dig Dis Sci* 2012;57:250–3.
6. van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML. High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:1181–9.
7. Sparrow MP, Hande SA, Friedman S, Cao D, Hanauer SB. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine.



- Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:209–14.
8. Oselin K, Anier K. Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1452–4.
9. Seinen ML, de Boer NKH, Smid K, van Asseldonk DP, Bouma G, van Bodegraven AA, et al. Allopurinol enhances the activity of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in inflammatory bowel disease patients during low-dose thiopurine therapy: preliminary data of an ongoing series. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2011;30:1085–90.
10. Blaker PA, Arenas M, Fairbanks L, Irving PM, Marinaki AM, Sanderson JJ. A biochemical mechanism for the role of allopurinol in TPMT inhibition. *Gastroenterology* 2011;140:S769.

## Commentary

Andrea E. Reid\*

Azathioprine and 6-mercaptopurine (6-MP) are effective treatments for inflammatory bowel disease. Multiple clinical trials have documented the effectiveness of azathioprine ( $2\text{--}3\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) and 6-MP ( $1.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) for inducing and maintaining remission in moderate-to-severe inflammatory bowel disease. The mean time to full effect is 3 months, although clinical improvement may be apparent in 4 to 8 weeks. Azathioprine/6-MP may be underused because of the delayed onset of action and because of a fear of toxicity, especially leukopenia, infection, and hepatotoxicity.

6-MP is converted nonenzymatically to 6-thioguanine (6-TGN), the biologically active metabolite responsible for the therapeutic response. 6-MP is also converted by thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) to 6-methylmercaptopurine (6-MMP), high concentrations of which can contribute to hepatotoxicity. Eighty-nine percent of the population has normal to high activities of TPMT. When TPMT activity is negligible (0.3% of population) or intermediate (10%–11%), 6-TGN concentrations are higher than normal, substantially increasing the risk of myelosuppression. When TPMT activity is very high, the clinical response

may be limited because of low 6-TGN concentrations. Some professional societies recommend pretreatment TPMT genotyping or phenotyping; however, compliance with this recommendation is unknown. When wild-type TPMT is documented, azathioprine/6-MP therapy can be started at or near the full therapeutic dose. In patients with TPMT heterozygosity, the starting dose of azathioprine/6-MP is one-third to one-half the standard dose and should be increased slowly. In both cases, the complete blood count must be monitored regularly for myelosuppression. Patients with negligible TPMT activity should not be treated with thiopurines. There are minimal data on very high TPMT activity and its effect on clinical response. Monitoring of 6-TGN is not recommended generally, but it can be helpful when the clinical response is muted. Low 6-TGN concentrations may indicate medication non-compliance or hyperactive TPMT activity. If the latter is documented (associated with high 6-MMP concentrations), escalated doses of azathioprine/6-MP or treatment with biologic agents may be appropriate.

Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Section, Washington, DC VA Medical Center Washington, DC.

\* Address correspondence to the author at: Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Section, Washington, DC VA Medical Center, 50 Irving St., NW, Washington, DC 20422. Fax 202-745-8453; e-mail andreareid2@va.gov.

Received April 22, 2013; accepted April 29, 2013.

DOI: 10.1373/clinchem.2012.200410

**Author Contributions:** All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

**Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest:** No authors declared any potential conflicts of interest.





## Article 2

---

### **Variabilité inter-individuelle de l'activité TPMT : dix ans d'expérience sur la pharmacogénétique des thiopurines et le suivi pharmacologique thérapeutique**

Laurent Chouchana <sup>1,2</sup>, Céline Narjoz <sup>3</sup>, Denis Roche <sup>3</sup>, Jean-Louis Golmard <sup>4</sup>, Brigitte Pineau <sup>5</sup>, Gilles Chatellier <sup>5</sup>, Philippe Beaune <sup>1,2,3</sup>, Marie-Anne Lorient <sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR-S 1147. Paris, France.

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>3</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou. Biochimie, Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire. Paris, France.

<sup>4</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Département de biostatistiques. Paris, France.

<sup>5</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou. Département d'informatique hospitalière. Paris, France.

### **Contexte**

L'importance des variations de la TPMT dans l'hétérogénéité des réponses cliniques aux thiopurines a abouti à l'intégration de la pharmacogénétique de la TPMT dans la pratique clinique courante. Ainsi, depuis 2002, l'Unité fonctionnelle de Pharmacogénétique et oncologie moléculaire de l'HEGP propose aux cliniciens une détermination, par phénotypage ou par génotypage, du statut TPMT des patients traités par thiopurine. Cette unité propose également un STP fondé sur le dosage des métabolites 6-TGN et 6-MMPN, depuis, respectivement, 2003 et 2009. Avec l'aide du Département d'Informatique hospitalière et de l'Unité de recherche clinique de l'HEGP, nous avons effectué une extraction informatique, à partir du serveur du Laboratoire de Biologie médicale, des variables suivantes : phénotype/génotype de la TPMT, dosage de 6-TGN et 6-MMPN, indications et posologie des thiopurines, ainsi que âge et sexe des patients. Ces données, après anonymisation, ont été colligées au sein d'une base de données. L'avis favorable du

Comité de Protection des Personnes Ile-de-France II a préalablement été obtenu pour cette étude (Annexe 5).

L'objectif de ce travail était d'effectuer, sur une très large population, des corrélations génotype-phénotype pour la TPMT, et d'évaluer l'impact de variations de la TPMT sur les concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN et en 6-MMPN, en lien avec des variables démographiques telles que l'âge et le sexe.

### **Principaux résultats et discussion**

Les données colligées au sein de la base de données concernaient 7360 patients, incluant 4911 patients ayant eu une détermination de la TPMT (génotypage/phénotypage) et 6775 dosages de métabolites. La distribution de l'activité TPMT, établie sur un très grand nombre de patients, a montré une distribution d'apparence « normale ». Cette distribution pouvait se décomposer en 4 phénotypes, les trois premiers ayant chacun une distribution gaussienne : activité TPMT basse (0,7 %), intermédiaire (10,4 %), élevée (76,1 %) et très élevée (12,7 %). L'identification de ce 4<sup>ème</sup> phénotype TPMT sur la base d'une analyse de la distribution nous permet d'évaluer l'impact d'une activité TPMT très élevée sur la production des métabolites thiopuriniques, potentiellement en lien avec des conséquences cliniques.

Les patients avec un génotype *TPMT* sauvage ont une activité 1,7 et 4,5 fois plus élevée que les patients, respectivement, hétérozygotes et homozygotes mutés. La corrélation génotype-phénotype a montré qu'il existe une grande variabilité d'activité au sein de chaque génotype. Notamment, environ 25 % des patients hétérozygotes ont une activité élevée/normale. De plus, au sein du groupe des patients pour lesquels il n'a pas été retrouvé de variants alléliques (*TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B*, *TPMT\*3C*), i.e. génotype sauvage, environ 5 % ont une activité intermédiaire ou basse, probablement en lien avec la présence de variants alléliques moins fréquents ou de mutations rares. Ainsi, même si la corrélation génotype-phénotype est globalement bonne (93,4 %), les valeurs prédictives positives et négatives du génotypage pour dépister les patients porteurs d'une activité TPMT déficiente (basse ou intermédiaire) sont, respectivement, de 77,4 % et de 95,4 %. Au final, le génotype *TPMT*, sur la base des trois SNP recherchés, ne représente que 24 % de la variabilité observée pour l'activité TPMT.

L'analyse des concentrations en 6-TGN a révélé des concentrations 1,6 fois plus élevées chez les patients ayant une activité TPMT déficiente, par comparaison aux patients ayant une activité élevée. De plus, en rapportant à la dose journalière d'azathioprine, cette différence atteint 2,5 fois. Nous n'avons pas trouvé de variations significatives des concentrations moyennes des 6-TGN ou des 6-MMPN chez les patients ayant une activité très élevée, par comparaison aux patients avec une activité élevée. En revanche, le ratio métabolique était significativement et positivement ( $r=0,25$  ;  $p<0,0001$ ) associé à l'activité TPMT. La TPMT n'étant pas le déterminant majeur, ces ratios métaboliques présentaient une grande variabilité au sein de chaque phénotype. Il y a également une tendance ( $12,1 \pm 14,5$  vs.  $19,7 \pm 32,4$ ) à des ratios métaboliques plus élevés chez les patients ayant une activité TPMT très élevée par rapport aux patients ayant une activité élevée. Par ailleurs, l'activité TPMT n'est en moyenne que très légèrement supérieure chez les patients ayant un ratio défavorable. Au total, il semble que même si l'activité TPMT n'est pas le déterminant majeur du ratio métabolique, elle le module positivement. De plus, nous avons pu identifier un seuil d'activité TPMT à 18,3 U/mL au-delà duquel il y a significativement présence de 3 fois plus de ratios défavorables ( $\geq 20$ ). En outre, nous avons également retrouvé des concentrations en 6-MMPN et des ratios 6-MMPN:6-TGN, respectivement, 1,6 et 2,2 fois plus élevés chez les femmes que chez les hommes, malgré des activités TPMT, des concentrations en 6-TGN et des doses d'azathioprine similaires. Ce résultat implique probablement des différences de métabolisme entre hommes et femmes dont les conséquences cliniques et thérapeutiques restent encore à déterminer à l'aide d'études ultérieures.

Dans un modèle multivarié, la dose d'azathioprine et le génotype TPMT étaient les facteurs prédictifs des concentrations en 6-TGN, alors qu'il fallait également intégrer le sexe comme facteur prédictif des concentrations en 6-MMPN et du ratio 6-MMPN:6-TGN. Notre travail a également concerné un sous-groupe de patients présentant un suivi longitudinal de 2,3 ans. A l'issue du STP, la moitié de ces patients présentait des concentrations en 6-TGN inférieures au seuil de 235 pmol/ $8 \times 10^8$  GR. Cela suggère que ce seuil n'est peut-être pas optimal pour atteindre l'efficacité.

En conclusion, notre travail a permis de caractériser les relations entre la TPMT et les métabolites sur une très grande population de patients. Il reflète également l'utilisation réelle de la détermination de la TPMT et du dosage des métabolites en situation de soins

courants hospitaliers. Le schéma de cette étude n'a pas permis l'intégration de données cliniques limitant les conclusions sur l'évolution clinique des patients. Au total, ces résultats illustrent l'utilité de la pharmacogénétique et du dosage des métabolites des thiopurines pour améliorer l'identification de cas de non observance et de patients à haut risque de toxicités ou de résistance thérapeutiques.

**Article publié dans *Pharmacogenomics* (cf. pages suivantes)**

**« Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring »**

Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard JL, Pineau B, Chatellier G, Beaune P, Lorient MA. *Pharmacogenomics*. 2014;15(6):745-57.

*Impact factor : 3,9*

**Communications affichées**

10<sup>th</sup> International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, Toronto, Oct 2013.  
Digestive Disease Week (DDW) 2011, Chicago, May 2011.



# Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring

**Background & aims:** TPMT activity and metabolite determination (6-thioguanine nucleotides [6-TGN] and 6-methylmercaptopurine nucleotides [6-MMPN]) remain controversial during thiopurine management. This study assessed associations between patient characteristics and TPMT activity, and their impact on metabolite levels. **Patients & methods:** A retrospective review of the laboratory database from a French university hospital identified 7360 patients referred for TPMT phenotype/genotype determination, and/or for 6-TGN/6-MMPN monitoring. **Results:** Four TPMT phenotypes were identified according to TPMT activity distribution: low, intermediate, normal/high and very high. Based on 6775 assays, 6-TGN concentrations were 1.6-fold higher in TPMT-deficient patients compared with TPMT-normal patients. Azathioprine dose and TPMT genotype were significant predictors of metabolite levels. Furthermore, 6-MMPN and 6-TGN: 6-MMPN ratios were, respectively, 1.6- and 2.2-fold higher in females than in males, despite similar TPMT, 6-TGN and azathioprine doses. An unfavorable ratio ( $\geq 20$ ) was associated with a slightly higher TPMT activity. **Conclusion:** These results illustrate the usefulness of pharmacogenomics and metabolite measurement to improve the identification of noncompliance and patients at high risk for toxicity or therapeutic resistance.

Original submitted 13 November 2013; Revision submitted 30 January 2014

**KEYWORDS:** 6-TGN ■ azathioprine ■ database analysis ■ personalized medicine ■ pharmacogenetics ■ therapeutic drug monitoring ■ thiopurine ■ TPMT

Thiopurine drugs, mainly azathioprine and 6-mercaptopurine (6-MP), are cytotoxic and are immunosuppressive drugs that are widely used to treat autoimmune disorders, inflammatory bowel disease or acute lymphoblastic leukemia [1]. Although clearly effective, azathioprine is characterized by considerable interindividual variability in the clinical response, with approximately 40% of patients failing to achieve a clinical remission, and 15–28% experiencing adverse effects such as hematological and hepatic toxicities [2–6]. Azathioprine is a prodrug, bioactivated into pharmacologically active metabolites such as 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-methylmercaptopurine nucleotides (6-MMPN) [1]. The multistep HPRT pathway results in the production of 6-TGN, whereas TPMT catalyzes the formation of 6-methylmercaptopurine and 6-MMPN [7]. Genetic polymorphisms on enzymes involved in thiopurine metabolism, such as TPMT, ITPase or XO could affect clinical response to thiopurines and be related to side effects [8]. Interindividual variability in these metabolite concentrations is largely related to genetic polymorphisms that affect TPMT activity [9]. Historically, among 298 blood donors, approximately 0.3% have low TPMT activity, 11% intermediate activity and

89% normal/high activity [10]; these three groups have two, one or no variant alleles, respectively [11]. To date, 39 TPMT variant alleles associated with decreased enzyme activity have been identified, of which only four (TPMT\*2, \*3A, \*3B and \*3C) account for approximately 95% of the genetic diversity in Caucasians [12–15]. The overall concordance rate between genotype and phenotype can vary according to ethnicity and has been estimated to be over 90% in Caucasians, and up to 98% with DNA sequencing [16–18]. Furthermore, 2–15% of patients have very high TPMT activity, above the normal interval, in the absence of any obvious underlying genetic cause [3,18–20].

Nongenetic factors can also affect TPMT activity. Mean TPMT activity was higher in liver biopsies from males than from females and intraerythrocyte TPMT activity was slightly lower in women in a large Spanish retrospective study [9,21]. The impact of age in both adults and children varied across studies [22–25]. Drugs, including thiopurines, can alter TPMT activity [26–28]. In keeping with the effects of these genetic and nongenetic factors, TPMT activity in large-scale studies covered a wide range of values, and antimodes are hardly identifiable [9,16,23,29].

Laurent Chouchana<sup>1,2</sup>,  
Celine Narjoz<sup>3</sup>, Denis  
Roche<sup>3</sup>, Jean-Louis  
Golmard<sup>4</sup>, Brigitte  
Pineau<sup>5</sup>, Gilles  
Chatellier<sup>5</sup>, Philippe  
Beaune<sup>1,2,3</sup> & Marie-  
Anne Lorient<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR-S 1147, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne  
Paris Cité, Paris, France

<sup>3</sup>Assistance publique-Hôpitaux de  
Paris, Hôpital Européen Georges  
Pompidou, Biochimie,  
Pharmacogénétique et Oncologie  
Moléculaire, 20 rue Leblanc, Paris,  
France

<sup>4</sup>Assistance publique-Hôpitaux de  
Paris, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière,  
Département de biostatistiques, Paris,  
France

<sup>5</sup>Assistance publique-Hôpitaux de  
Paris, Hôpital Européen Georges  
Pompidou, Département  
d'informatique hospitalière, Paris,  
France

\*Author for correspondence:

Tel.: +33 1 5609 3882

Fax: +33 1 5609 3393

[marie-anne.lorient@egp.aphp.fr](mailto:marie-anne.lorient@egp.aphp.fr)

Future  
Medicine

fsg  
part of

Patients with low or intermediate TPMT activity are more likely to have toxic intraerythrocyte 6-TGN levels, above  $450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  red blood cell (RBC), associated with an increased risk of neutropenia [30–32]. Conversely, patients with very high TPMT activity could preferentially produce 6-MMPN, a metabolite responsible for hepatotoxicity when present in sustained levels above  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC [31]. These patients are more prone to exhibit an unfavorable 6-MMPN:6-TGN ratio, associated with failure to obtain a thiopurine response even after dose escalation [5,33]. Finally, several studies have empirically established a threshold of  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC for clinical response and a 6-MMPN:6-TGN ratio above 20:1 for predicting treatment failure [31,34,35].

Few data from large-scaled studies are available on the relationship between TPMT activity and thiopurine metabolite profiles and its consequences for therapeutic management [25,35–37]. The aim of this study based on 10 years of experience in the pharmacogenetics unit of a French university hospital was to assess genetic and nongenetic determinants of interindividual variability in TPMT activity and to evaluate the influence of this variability on thiopurine metabolite levels and, consequently, on therapeutic management.

## Patients & methods

### ■ Patients

We retrospectively reviewed the laboratory database of the Hôpital Européen Georges Pompidou (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). We included the patients referred to the pharmacogenetics unit (2002–2011) in relation with thiopurine therapy, for TPMT analysis and/or for therapeutic drug monitoring (TDM) based on 6-TGN and 6-MMPN assays (FIGURE 1). Patients treated with thiopurine received azathioprine, except for ten patients that received 6-MP. For the latter, daily 6-MP drug dosage has been converted in azathioprine-equivalent using a factor of 2.08 [38].

### ■ Ethics statement

This study received approval (#2013-07-06) from the local human ethics committee (institutional review board registration #00001072). According to French legislation, no written consents are required for observational retrospective studies. All data were analyzed anonymously.

### ■ TPMT analysis

#### Phenotyping

TPMT activity was assessed in RBCs using the reverse-phase HPLC method previously described [39]. Briefly, erythrocyte lysates were incubated with 6-MP, *S*-adenosylmethionine (cofactor of TPMT), dithiotreitol (protecting thiol group from oxidation) and allopurinol (inhibiting XO). After 1 hour, 6-methylmercaptapurine formed is measured. The coefficient of variation (CV) within-run and between-run varied between 3.4–7.9% and 8.3–12%, respectively [39]. The quality assurance plan set up in the laboratory also displayed good precision results with within-run and between-run CV between 1.5–2.4% and 7.2–9.1%, respectively. For patients having more than one TPMT activity determination, only the first was included in the analyses; however, we used the data from these patients to evaluate intraindividual TPMT variations over time.

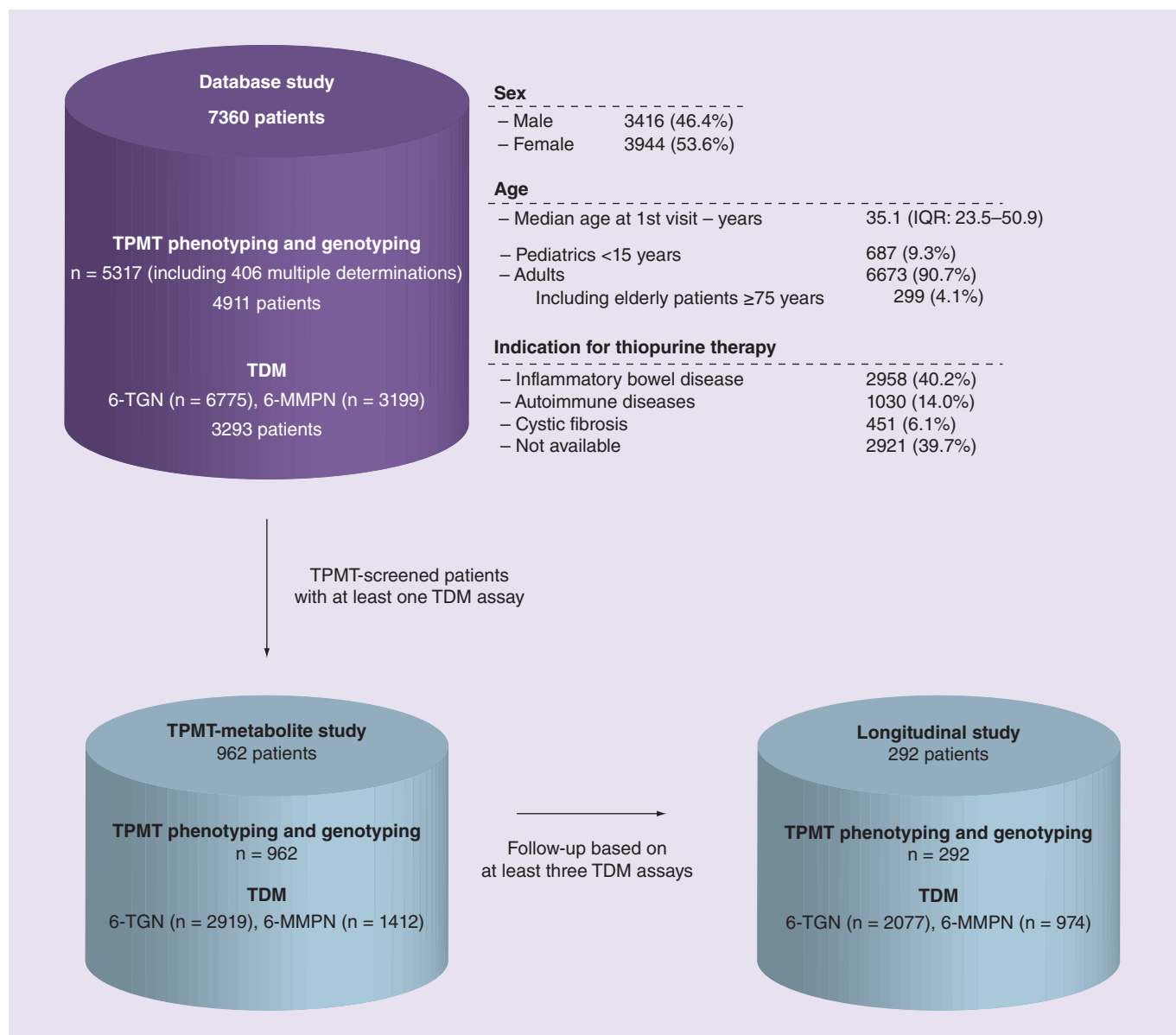
#### Genotyping

Genotyping was restricted to patients with TPMT activity  $\leq 11.0 \text{ nmol}/\text{h}/\text{ml}$  RBC (U/ml) and who consented to genotyping. Patients with activity  $> 11.0 \text{ U}/\text{ml}$  were classified as having the wild-type genotype [39,40]; however, among them, 216 patients underwent genotyping after specific request. Conventional PCR-based assays were used to detect the major *TPMT* inactivating alleles (*TPMT*\*2, \*3A, \*3B and \*3C) until 2004 and the TaqMan® DME Assay (Applied Biosystems, France) for allelic discrimination thereafter [11]. Alleles exhibiting none of the three tested SNPs (on exons 5, 7 and 10) were assumed to be the wild-type allele (*TPMT*\*1).

### ■ 6-TGN & 6-MMPN intraerythrocyte concentrations

6-TGN and 6-MMPN concentrations were assessed in RBCs using the modified reverse-phase HPLC method described elsewhere, starting from 2003 and 2009, respectively [41]. Standard curves were linear over the concentration range of  $50\text{--}1500 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC for 6-TGN ( $r^2 = 0.99$ ) and  $50\text{--}15,000 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC for 6-MMPN ( $r^2 = 0.99$ ). Within-run and between-run CV for 6-TGN and 6-MMPN assays were 3.1–6.3%, 7.2–12.8%, 2.0–2.4% and 3.9–10.9%, respectively. Samples with values below the limit of quantification ( $50 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC) were excluded from the analysis. The therapeutic range for 6-TGN was considered as  $235\text{--}450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC. The upper limit for 6-MMPN was  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  RBC.





**Figure 1. Data used in the study.** Shows the data included in the Database study, TPMT-metabolite study and Longitudinal study. 6-MMPN: 6-methylmercaptapurine nucleotides; 6-TGN: 6-thioguanine nucleotides; IQR: Interquartile range; TDM: Therapeutic drug monitoring.

### ■ Statistical analysis

Data are described as mean  $\pm$  standard deviation, median (interquartile range [IQR]) or n (%). Variables were compared between groups using parametric (student, ANOVA) and non-parametric (Mann–Whitney, Wilcoxon, Kruskal–Wallis) tests, and percentages using the  $\chi^2$  test. Variable distributions were examined using the d’Agostino–Pearson normality test and the Quantile–Quantile (Q–Q) plot graphical approach. Spearman correlation and mixed linear model was performed to assess relationships between variables. Relationships between metabolite concentrations, considered as the dependent variables, and TPMT phenotype,

TPMT genotype, sex, age and azathioprine dose, considered as the independent variables, were assessed using mixed linear models. The individual effect was taken into account by a random intercept, and the effects of the previous independent variables were fixed effects. The analyses were performed using two steps: in the first, each of the dependent variables was included in a univariate mixed linear model, and in a second step, a multivariate mixed linear model was obtained by backward selection. Significant variables with a p-value  $<0.15$  in the univariate analysis were included in the initial multivariate model, and variables with a p-value  $<0.05$  were retained in the final multivariate model. Two-sided p-values



below 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using Prism 5.0 (Graph-Pad, CA, USA) and SAS 9.3 (SAS Institute Inc., NC, USA).

## Results

### ■ Study patients

We identified 7360 patients (3416 males, 3944 females); median age was 35.1 (IQR: 23.5–50.9) years, with a range from 0.3 to 93.6 years. Inflammatory bowel disease was the indication for thiopurine therapy in 40% of patients and was unknown, that is, data unavailable, for approximately another 40%. Database aggregates 5317 TPMT determinations ( $n = 4911$  patients), 6775 6-TGN and 3199 6-MMPN assays ( $n = 3293$  patients; FIGURE 1).

### ■ TPMT pharmacogenetics

#### Phenotyping

TPMT activity was determined in 4911 patients. Mean TPMT activity was  $12.2 \pm 3.3$  U/ml and a 2.5-fold difference was found between the 5th and 95th percentile (7.0 and 17.3 U/ml, respectively). Values were slightly higher in males than in females ( $12.3 \pm 3.3$  vs  $12.1 \pm 3.3$  U/ml;  $p < 0.01$ ). TPMT activity was not influenced by patient age overall, but was, within wild-type patients, approximately 15% higher before 5 years of age than in older patients ( $p < 0.01$ ; SUPPLEMENTARY FIGURE 1, [www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.14.32](http://www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.14.32)). TPMT activity was significantly higher in patients with cystic fibrosis compared with other patients ( $12.9 \pm 3.7$  vs  $12.2 \pm 3.3$  U/ml;  $p < 0.0001$ ).

TPMT activity distribution was not normal ( $p < 0.0001$ ; FIGURE 2). The Q-Q plot graph showed four TPMT phenotypes, with normally distributed values in the first three: low ( $<4.3$  U/ml), 36 (0.7%) patients; intermediate (4.3–8.7 U/ml), 512 (10.4%) patients; normal/high (8.7–15.5 U/ml), 3738 (76.1%) patients; and very high ( $\geq 15.5$  U/ml), 625 (12.7%) patients (FIGURE 2).

Among patients with multiple TPMT determinations, 231 had two determinations carried out at least 3 months apart, that is, before and during thiopurine treatment. Although individually, slight variations for TPMT activity can be observed during thiopurine treatment either higher or lower than before treatment, mean TPMT activity and standard deviation remained unchanged over time ( $12.2 \pm 3.4$  vs  $12.1 \pm 3.4$  U/ml;  $p = 0.56$ ).

#### Genotyping

Of the 4911 TPMT phenotyped patients, 1584 underwent TPMT genotyping; 105 (6%)

patients eligible for TPMT genotyping (activity  $<11.0$  U/ml) did not consent to this test. Among the 4806 patients included in the analysis of TPMT genotype–phenotype concordance, 30 (0.6%) had homozygous variant alleles or compound heterozygosity and 390 (8.1%) were heterozygotes; the remaining 4386 (91.3%) patients were classified as wild-type, assuming that patients with TPMT activity  $>11.0$  U/ml did not carry any variant alleles. The observed allelic frequencies were 95.3% for TPMT\*1, 3.07% for TPMT\*3A, 0.94% for TPMT\*3C, 0.55% for TPMT\*2 and 0.13% for TPMT\*3B (SUPPLEMENTARY TABLE 1).

### Genotype–phenotype concordance

TPMT activity in wild-type patients ranged from 3.6 to 61.5 U/ml; two patients had outlying values of 53.9 and 61.5 U/ml. Wild-type patients had 1.7- and 4.5-fold higher mean TPMT activity than did heterozygous and homozygous variant patients, respectively ( $12.7 \pm 2.9$  vs  $7.4 \pm 1.8$  and vs  $2.8 \pm 1.8$  U/ml, respectively;  $p < 0.0001$ ; FIGURE 3). TPMT genotype, according to the three major SNPs, accounted for 24% of the interindividual variability in TPMT activity.

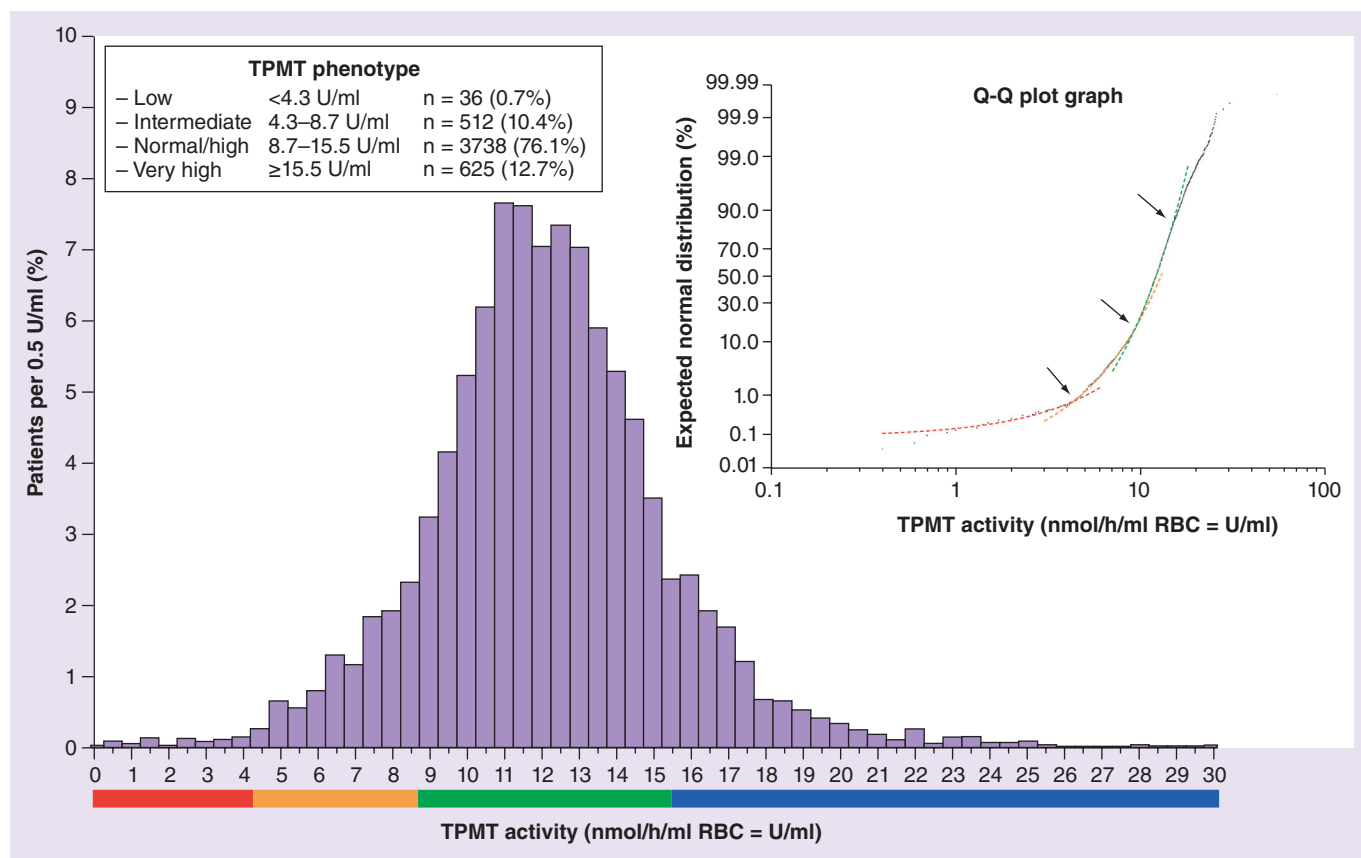
The overall concordance rate between TPMT genotype and phenotype was 93.4% while it was only 73.3% among heterozygotes. For the latter group, large heterogeneity resulted in 104 (26.7%) heterozygous patients misclassified. Thus, of 390 heterozygous variant allele carriers, 95 (24.4%) had normal TPMT activity, up to 12.2 U/ml, and nine (2.3%) had low TPMT activity (TABLE 1). Moreover, of 30 patients carrying homozygous variant alleles, seven (23%) had intermediate TPMT activity. Finally, among the 4386 patients who carried none of the tested TPMT variant alleles, that is, classified as wild-type for TPMT genotype, 203 (4.6%) had a TPMT deficiency.

The positive predictive value of genotyping for detecting TPMT deficiency ( $<8.7$  U/ml) was 77.4% and the negative predictive value was 95.4%. The area under the receiver-operating characteristic curve for TPMT deficiency was 0.96.

### ■ TDM

#### Metabolite concentrations in the database study

Thiopurine metabolites were measured 6775-times in 3293 patients. Median 6-TGN and 6-MMPN concentrations were 214 (IQR: 147–313) pmol/ $8 \times 10^8$  RBC and 976 (IQR: 409–2651) pmol/ $8 \times 10^8$  RBC, respectively.



**Figure 2. Distribution of TPMT activity in 4911 patients.** TPMT phenotypes: low (<4.3 U/ml), intermediate (4.3–8.7 U/ml), normal/high (8.7–15.5 U/ml) and very high (≥15.5 U/ml). Two patients had outlying values for TPMT activity of 53.9 and 61.5 nmol/h/ml RBC (U/ml), respectively. On the Q-Q plot graph, data for the low, intermediate and normal/high phenotypes were normally distributed as depicted by the red, orange and green dotted lines, respectively. Data for the very high phenotype did not match with a normal distribution. Arrows indicate antimodes between low–intermediate, intermediate–normal and normal–very high phenotypes. d'Agostino-Pearson normality test:  $p < 0.0001$ . Q-Q: Quantile-Quantile; RBC: Red blood cells.

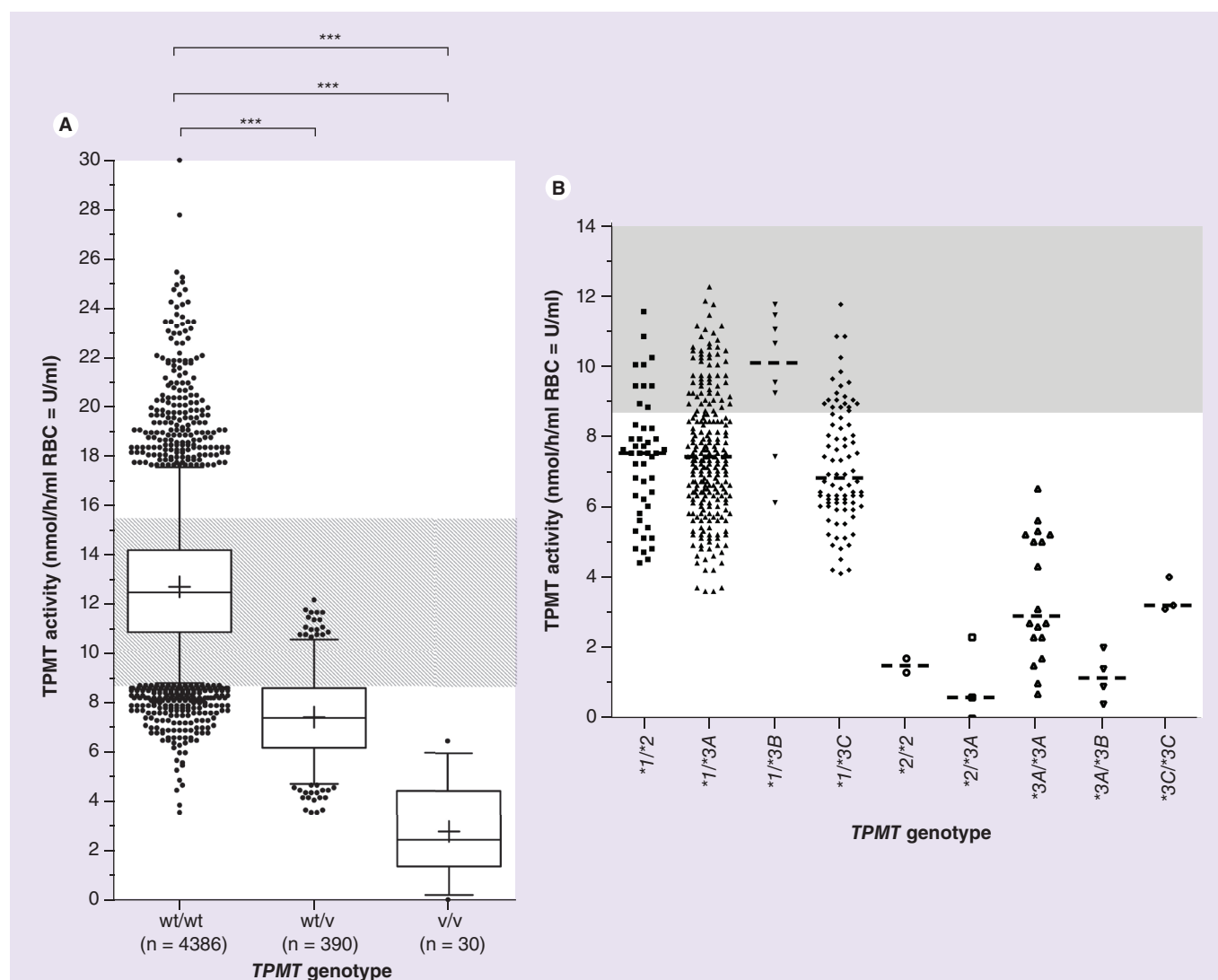
For 6-TGN, 3832 (57%) values were under  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  and 700 (10%) were over  $450 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . For 6-MMPN, 295 (9%) values were over  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ . 6-TGN and 6-MMPN concentrations showed a poor correlation with each other ( $r = 0.056$ ;  $p = 0.0014$ ). Although 6-TGN and 6-MMPN concentrations were not influenced by age overall, they were, respectively, 18 and 55% lower in children younger than 5 years than in adults ( $212 \pm 185$  vs  $258 \pm 209 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ,  $p < 0.0001$ ;  $1005 \pm 1621$  vs  $2254 \pm 3060 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ,  $p < 0.0001$ ). Mean 6-MMPN concentration was 1.6-fold higher in females than in males ( $2665 \pm 3428$  vs  $1635 \pm 2282 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ;  $p < 0.0001$ ), whereas 6-TGN concentrations and azathioprine doses were similar.

Median 6-MMPN:6-TGN ratio was 4.1 (IQR: 1.6–10.3). The ratio was 2.2-fold higher in females than in males ( $12.1 \pm 18.9$  vs  $5.4 \pm 6.6$ ;  $p < 0.0001$ ), and 18.5% ( $n = 265$ ) of females had a ratio  $\geq 20$  compared with 7.6%

( $n = 124$ ) of males ( $p < 0.0001$ ; odds ratio [OR]: 2.78; 95% CI: 2.22–3.49).

#### Factors associated with metabolite concentrations in the TPMT-metabolite study

Mean 6-TGN concentration was 1.6-fold higher in patients with TPMT deficiency than in patients with normal TPMT activity ( $408 \pm 369$  vs  $252 \pm 217 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ ;  $p < 0.0001$ ) and the increase was 2.5-fold for the mean 6-TGN concentration per mg of azathioprine dose ( $6.4 \pm 4.6$  vs  $2.6 \pm 2.4 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}/\text{mg}$ ;  $p < 0.0001$ ; TABLE 2, FIGURE 4A & B). The 6-TGN concentrations were not significantly different between normal and very high TPMT activity patients (FIGURE 4A). Among TPMT-deficient patients, 129 (32.5%) had 6-TGN levels  $>450 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ , compared with 31 (7.8%) among very high TPMT patients; 6-TGN values  $<235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  were found in 131 (33%) TPMT-deficient patients



**Figure 3. Variability in TPMT activity according to *TPMT* genotype.** (A) Box-and-whisker plots for the wild-type, heterozygous and homozygous variant genotypes. Boxes and whiskers include data between the 25th and 75th percentiles and the 5th and 95th percentiles, respectively. Outliers are depicted as dots, median values as solid lines, and mean values as solid crosses. (B) Dot plots for the variant alleles. Median values are depicted as dashed lines. The gray boxes represent the reference range (8.7–15.5 U/ml) for normal/high TPMT activity.

Kruskal–Wallis test: \*\*\* $p < 0.0001$ .  
RBC: Red blood cell; v: Variant; wt: Wild-type.

and in 235 (58.9%) patients with very high TPMT activity ( $p < 0.0001$ ; TABLE 2). The

**Table 1. Concordance between *TPMT* genotype and phenotype in 4806 patients.**

<i>TPMT</i> genotype	<i>TPMT</i> activity (nmol/h/ml RBC)			
	<4.3	4.3–8.7	8.7–15.5	≥15.5
v/v	23 <sup>†</sup>	7	0	0
wt/v	9	286 <sup>†</sup>	95	0
wt/wt	2	201	3558 <sup>†</sup>	625 <sup>†</sup>

Of the 4911 *TPMT* phenotyped patients, 1584 underwent *TPMT* genotyping; 105 (6%) patients eligible for *TPMT* genotyping (activity <11.0 U/ml) did not consent to this test. Finally, *TPMT* genotype–phenotype concordance was assessed in 4806 patients.

<sup>†</sup>Patients with a concordant *TPMT* genotype and phenotype.

RBC: Red blood cell; v: Variant; wt: Wild-type.

6-MMPN concentrations increased across intermediate, normal and very high TPMT phenotypes ( $1314 \pm 2049$ ,  $2066 \pm 2762$ ,  $2616 \pm 3650$  pmol/ $8 \times 10^8$  RBC, respectively;  $p < 0.0001$ ; FIGURE 4C & D). Regarding genotype influence on metabolites, we observed that all the 6-TGN values were above the therapeutic range for patients carrying a homozygous variant *TPMT* genotype (SUPPLEMENTARY FIGURE 2).

The 6-MMPN:6-TGN ratio correlated positively with TPMT activity ( $r = 0.25$ ;  $p < 0.0001$ ) and was significantly different between TPMT phenotypes ( $p < 0.0001$ ; SUPPLEMENTARY FIGURE 3A & B). Patients with an unfavorable ratio  $\geq 20$  (17.4%) had higher mean TPMT activity than patients

**Table 2. Influence of TPMT phenotype on 6-TGN and 6-MMPN concentrations, 6-TGN:6-MMPN ratio and azathioprine dose in the TPMT-metabolite study (n = 962 patients).**

	TPMT activity (nmol/h/ml RBC)			p-value
	<8.7	8.7–15.5	≥15.5	
6-TGN (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC)	408 ± 369	252 ± 217	240 ± 148	<0.0001
6-MMPN (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC)	1314 ± 2049	2066 ± 2762	2616 ± 3650	<0.0001
Azathioprine dose (mg/day)	88.3 ± 36.7	124.0 ± 44.0	108.5 ± 49.3	<0.0001
6-TGN/azathioprine dose (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC/mg)	6.4 ± 4.6	2.6 ± 2.4	3.1 ± 2.9	<0.0001
6-MMPN/azathioprine dose (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC/mg)	12.8 ± 16.4	17.0 ± 20.5	25.5 ± 33.1	0.0005
Number of 6-TGN <235 pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC	131 (33.0)	1259 (59.3)	235 (58.9)	
Number of 6-TGN values between 235–450 pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC	137 (34.5)	670 (31.6)	133 (33.3)	
Number of 6-TGN >450 pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC	129 (32.5)	194 (9.1)	31 (7.8)	
Total of 6-TGN data	397 (100)	2123 (100)	399 (100)	<0.0001
Number of 6-MMPN <5700 pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC	217 (94.8)	914 (92.1)	165 (86.4)	
Number of 6-MMPN ≥5700 pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC	12 (5.2)	78 (7.9)	26 (13.6)	
Total of 6-MMPN data	229 (100)	992 (100)	191 (100)	0.006
6-MMPN:6-TGN ratio	5.2 ± 7.4	12.1 ± 14.5	19.7 ± 32.4	<0.0001

*Data are presented as mean ± standard deviation or n (%).*  
*6-MMPN: 6-methylmercaptapurine nucleotides; 6-TGN: 6-thioguanine nucleotides; RBC: Red blood cell.*

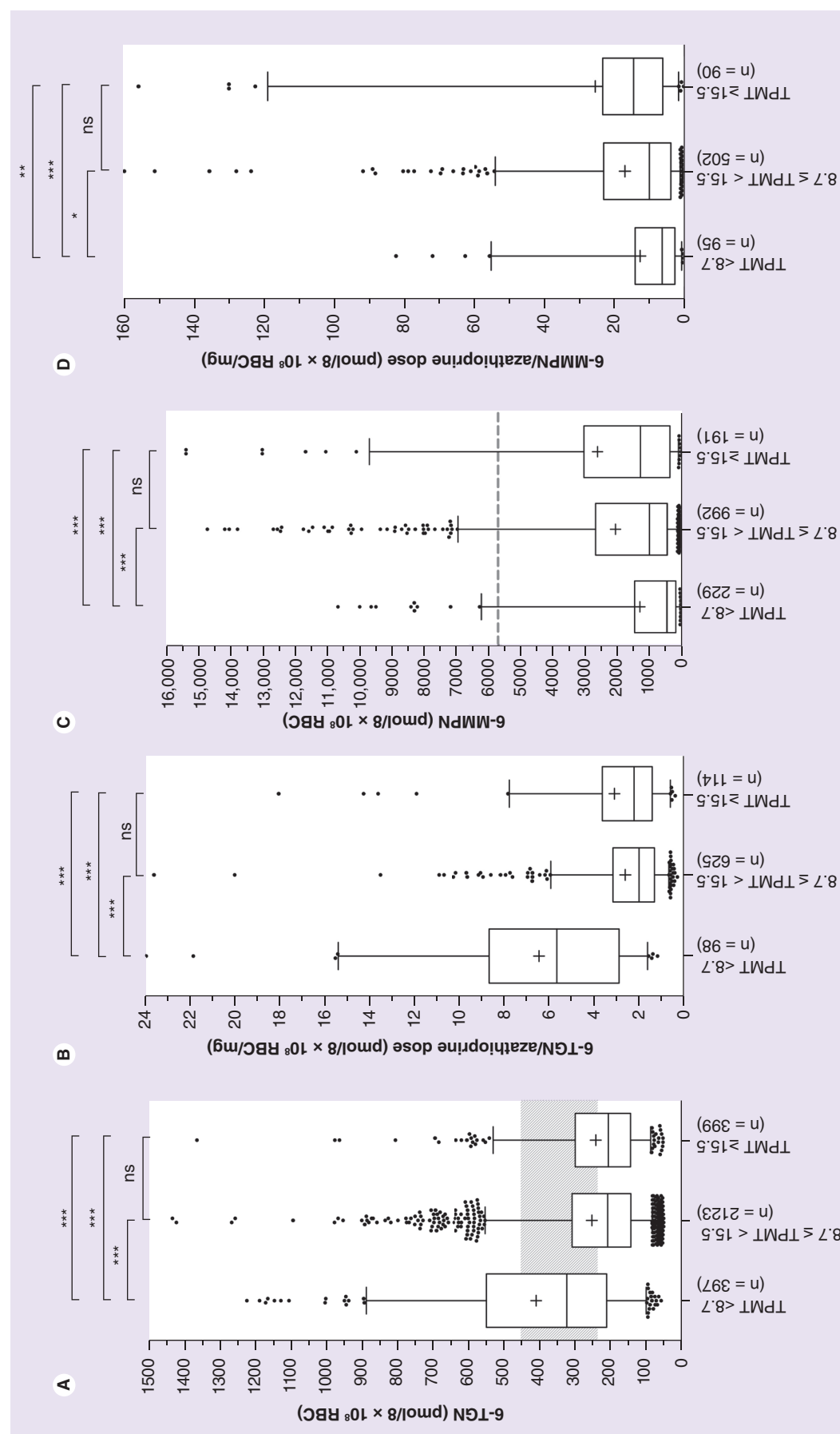
with a ratio <20 (13.6 ± 5.9 vs 11.7 ± 3.1 U/ml;  $p < 0.001$ ; SUPPLEMENTARY FIGURE 3C). In patients with very high TPMT activity (≥15.5 U/ml), unfavorable ratios were not significantly more common than in other patients (25.4 vs 16.3%; OR: 1.74; 95% CI: 0.96–3.19;  $p = 0.07$ ); however, a cutoff of 18.3 U/ml is noteworthy above which unfavorable ratios were significantly more frequent (OR: 2.97; 95% CI: 1.05–8.37;  $p = 0.03$ ).

By univariate mixed linear model, azathioprine dose ( $p = 0.038$ ), TPMT phenotype ( $p = 0.0016$ ) and *TPMT* genotype ( $p < 0.0001$ ) were associated with 6-TGN concentrations in adults and only azathioprine dose and *TPMT* genotype remains significant in the multivariate model ( $p = 0.047$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Regarding 6-MMPN concentrations in adults, azathioprine dose ( $p < 0.0001$ ), TPMT phenotype ( $p = 0.0005$ ), *TPMT* genotype ( $p < 0.0001$ ), age ( $p = 0.044$ ) and sex ( $p = 0.0068$ ) were significant predictors in the univariate model, while the final multivariate model included azathioprine dose ( $p < 0.0001$ ), *TPMT* genotype ( $p = 0.0002$ ) and sex ( $p = 0.0004$ ). The latter were also predictors of the 6-MMPN:6-TGN ratio using a

multivariate model ( $p < 0.0001$ ). Finally, mixed linear models explained 41.7, 50.2 and 55.9% of the variance of 6-TGN, 6-MMPN and 6-TGN:6-MMPN concentrations, respectively.

### Longitudinal study

We identified 292 patients with at least three TDM values (median: 5 [IQR: 3–9]). Median follow-up duration was 2.3 (IQR: 1.1–3.8) years, with 2077 metabolite determinations. The last metabolite assays showed a higher proportion of 6-TGN concentrations within the therapeutic range (235–450 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC), compared with the first assays (110 [38%] vs 71 [24%];  $p < 0.0001$ ); even if underdosing was noted in 147 (50%) patients compared with 203 (70%) at the first assays ( $p < 0.0001$ ; FIGURE 5). Among underdosed patients, the proportion of patients with normal and very high TPMT activity was higher than the proportion with deficient TPMT activity, both at the first assay (72 and 78% vs 49%, respectively;  $p < 0.001$ ) and at the last assay (59 and 53% vs 26%, respectively;  $p < 0.01$ ). Finally, 34 (12%) patients (9, 22 and 3 with deficient, normal and very high TPMT



**Figure 4. Variability in metabolite concentrations according to TPMT phenotype.** (A) 6-TGN concentrations according to TPMT phenotype. (B) 6-TGN concentrations per daily mg of azathioprine according to TPMT phenotype. (C) 6-MMPN concentrations according to TPMT phenotype. (D) 6-MMPN concentrations per daily mg of azathioprine according to TPMT phenotype. Boxes and whiskers include data between the 25th and 75th percentiles and the 5th and 95th percentile, respectively. Outliers are depicted as dots, median values as solid lines, and mean values as solid crosses. The gray box represents the therapeutic range (235–450 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC) for 6-TGN. The dotted gray line represents the cutoff (5700 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC) above which 6-MMPN is associated with hepatotoxicity.

Kruskal–Wallis test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .  
6-MMPN: 6-methylmercaptopurine nucleotides; 6-TGN: 6-thioguanine nucleotides; RBC: Red blood cell.



activity, respectively) remained overdosed at the last assay, compared with 18 (6%) at the first assay (8, 7 and 3 with deficient, normal and very high TPMT activity, respectively).

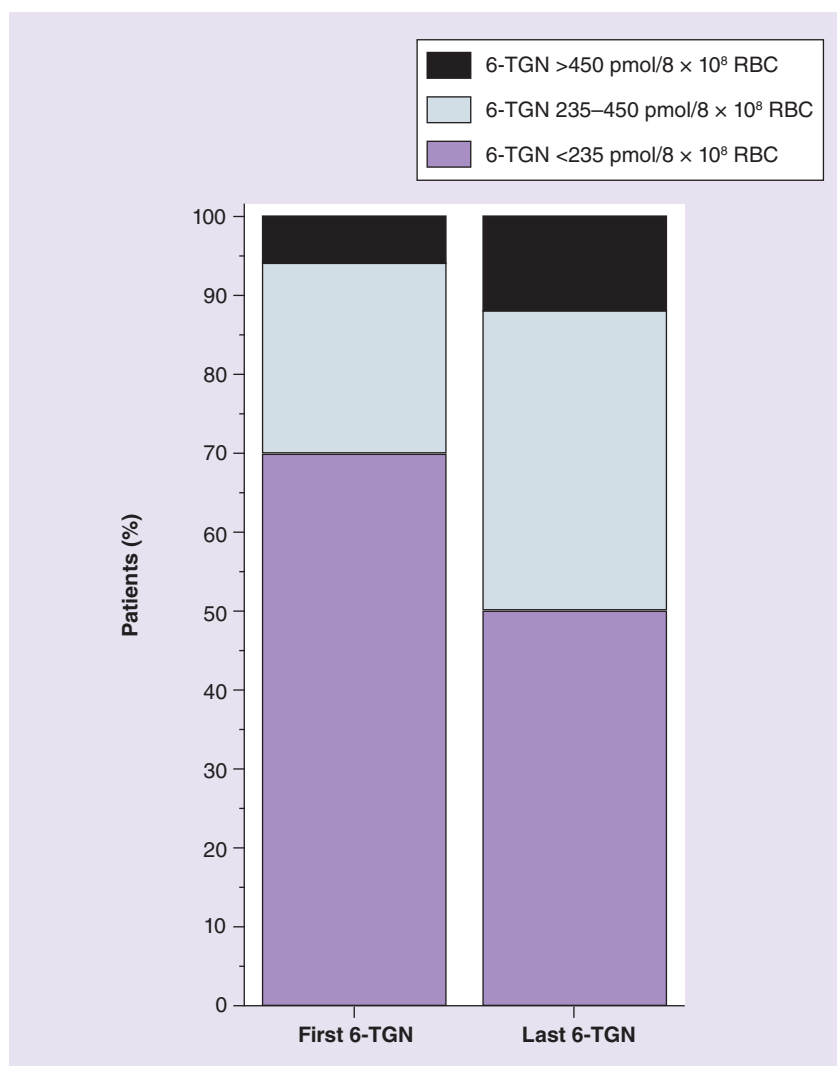
## Discussion

Current international guidelines recommend the use of pharmacogenetics for therapeutic management of thiopurines [13,14]. This approach allows for the reduction of thiopurine toxicities and presents a favorable cost–effectiveness ratio [42,43]. However, the usefulness of metabolite measurements and the impact of interindividual TPMT variability on the therapeutic response remain debated. Here, we report retrospective single-center data obtained routinely over 10 years from 7360 patients including children, adults and elderly individuals. Our results confirm the considerable interindividual variability in TPMT activity, occurring even within each *TPMT* genotype, and leading to wide variations of metabolite concentrations.

To summarize, TPMT activity displayed four phenotypes; *TPMT* genotype was a predictive determinant for 6-TGN and 6-MMPN levels; metabolite concentrations were associated with azathioprine dose; 6-MMPN concentrations and metabolite ratios differed between sexes; and finally TDM was associated with a significant decrease in the proportion of patients with 6-TGN concentrations outside the therapeutic range.

A trimodal distribution of TPMT activity was reported in 1980 in 298 healthy blood donors [10]. Subsequently, several large studies failed to replicate this finding, chiefly because there was no clear intermediate TPMT group [9,23,35]. The frequency histogram of TPMT activity in our study did not clearly show three patient groups; instead, TPMT activity varied across a broad range of values within each genotype. However, a Q-Q plot graphical approach identified four groups, with normally distributed values in the first three: low (0.7%), intermediate (10.4%), normal/high (76.1%) and very high (12.7%) TPMT activity. A very high TPMT activity group was previously identified in studies of patients or healthy individuals and accounted for 3.7–15% of the study populations [3,19,23]. The plurimodal distribution of TPMT activity is largely ascribable to genetic polymorphisms resulting in partial or complete TPMT deficiency [1,16,18]. A variable number of tandem repeats within the 5′-flanking region of the *TPMT* gene is associated with elevated TPMT activity, but the molecular basis of the ultrarapid phenotype remains unknown [19].

TPMT activity differed significantly across homozygous variant carriers, heterozygotes and wild-type patients. The allelic frequencies were consistent with those from other large studies of Caucasians [13]. Genotype–phenotype concordance was good overall (93.4%), but the *TPMT* genotype as assessed based on the three main SNPs, accounted for only a quarter of the phenotype variability. Thus, substantial variability occurred within each genotype. For instance, in the wild-type group after exclusion of two patients with outlying values, TPMT activity varied 8.3-fold, in keeping with the 3- to 8.7-fold variability reported previously [18,22,23]. Differences across studies may be ascribable to differences in study populations (patients or blood donors), comorbidities, or concomitant treatments [9]. Moreover, very large studies of



**Figure 5. Proportion of patients under, within or below the 6-TGN therapeutic range at first and last metabolite determinations within the longitudinal study (n = 292).**

6-TGN: 6-thioguanine nucleotides; RBC: Red blood cell.

thiopurine-treated patients, such as ours, may be biased toward extreme TPMT activity values. The overlapping in TPMT activity between genotypes, especially in heterozygotes, undermines the accuracy of TPMT phenotype prediction. This is in keeping with the known existence of undetected rare SNPs contributing to approximately 3% of variant alleles in Caucasians [13,18]. However, testing for rare variant alleles does not significantly improve *TPMT* genotype reliability, especially in the intermediate group [18].

TPMT activity can be influenced by non-genetic factors (e.g., sex, age, indication for thiopurine therapy) [9,21,23,25]. We found slightly higher TPMT activities in males, in patients younger than 5 years, and in patients with cystic fibrosis. These differences, although statistically significant, were probably too small to have an actual clinical impact. A previous Italian study also found higher activities in patients younger than 5 years, but another study found no difference [22,23]. Such discrepancies may be related to differences in patient ethnicity, analytical method or erythropoiesis physiology in children [24]. Finally, as thiopurine therapy has been reported to induce TPMT activity, we evaluated patients with multiple TPMT determinations, that is, before and during treatment. We found, overall, a stable TPMT activity and even if slight intraindividual variations occur, they are not likely to change TPMT phenotype [26,28,30,44]. We cannot exclude that intraindividual variations or assay variations contributed to the observed fluctuations in TPMT activity [44].

In our study, as expected, the wide inter-individual variability in TPMT activity had meaningful therapeutic effects in patients receiving azathioprine therapy: TPMT deficiency was significantly associated with 6-TGN elevation and 6-MMPN decrease [36,45]. Using a multivariate mixed linear model taking into account the individual effect, *TPMT* genotype and azathioprine dose were the main predictors of both metabolite concentrations. However, the 6-MMPN:6-TGN ratio was positively but weakly correlated with TPMT activity, suggesting that the metabolite ratio is mainly determined by other factors than TPMT. In keeping with this possibility, the proportion of patients with a metabolite ratio  $\geq 20$  was almost threefold higher in females than in males and the mean ratio in females was 2.2-fold higher owing to higher mean 6-MMPN concentration with similar mean 6-TGN concentration and TPMT activity. The multivariate mixed linear model has also highlighted this strong

sex effect for determining 6-MMPN concentrations and metabolite ratios, but not for 6-TGN concentrations. These results, consistent with a previous report, are ascribable neither to the azathioprine doses, which were similar in males and females, nor to the small sex-related difference in TPMT activity [37]. Their impact on the safety of thiopurine therapy in females requires clarification, even if a recent large retrospective study conversely suggests a lower risk for thiopurine-induced hepatotoxicity in females [46].

We observed only a small, but significant, difference in TPMT activity between the groups with 6-MMPN:6-TGN ratio values  $<20$  and  $\geq 20$ . Furthermore, the mean ratio increased with TPMT activity but remained  $<20$  even in the very high TPMT group, in accordance with an earlier study showing that very high TPMT activity was not associated with pharmacological resistance to thiopurines [35]. However, having a TPMT activity greater than 18.3 U/ml was associated with a nearly threefold increase in the risk of having 6-MMPN:6-TGN ratio values  $\geq 20$  in our study. Since increasing the azathioprine dose would fail to improve 6-TGN concentrations in the context of pharmacological resistance, adding allopurinol and dramatically diminishing the azathioprine dose may be a useful therapeutic strategy in this patient subgroup [33].

Our longitudinal study strongly supports a beneficial effect of TDM, since the proportion of patients within the therapeutic range increased in all TPMT groups, chiefly via a decrease in underdosed patients. However, half the patients remained underdosed after long-term follow-up. Apart from poor treatment adherence, this result may indicate that azathioprine dose adjustments are not effective in achieving the therapeutic range or that a clinical response could probably be obtained with 6-TGN concentrations  $<235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ , particularly in children, who had lower 6-TGN values than did adults in our study. This certainly emphasizes the importance of the differential assay of mono-, di- and tri-phosphate metabolites in TDM. In addition, the high proportion of patients with TPMT deficiency among the overdosed patients, exposed to recurrent severe hematological toxicity, suggests that azathioprine dose adjustments may fail to counteract the effect of TPMT deficiency [30,36]. Studies are needed to evaluate the effect on toxicities, including lymphoma, and clinical responsiveness of lasting exposure to high 6-TGN concentrations [47].

Our study has several limitations. First, the retrospective design does not allow us to assess

treatment adherence or to ensure that metabolite measurements were carried out at the steady state. However, this study reflects routine practice and allows us to draw conclusions to improve therapeutic management. Second, clinical data would have been valuable to assess thiopurine clinical response according to TDM levels.

## Conclusion

In conclusion, based on 10 years of experience with pharmacogenetic testing in a very large patient population, we reported a strong influence of TPMT interindividual variability on metabolite concentrations. A multivariate linear mixed model confirmed that *TPMT* genotype and azathioprine dose were the main determinants for metabolite concentrations. This indicates that pharmacogenetic testing for

*TPMT* has potential clinical value for personalized dosing in patients treated with thiopurines. Furthermore, particularly for the methylated metabolites, we pointed out the positive association between female sex and 6-MMPN concentrations requiring further research to assess its impact on safety and efficacy. Our results underline the importance of TDM to improve the identification of noncompliance and patients at high risk for toxicity or therapeutic resistance. Finally, computational tools such as databases can help to strengthen the implementation of pharmacogenetics and TDM into clinical practice.

## Future perspective

Further studies are required for optimizing 6-TGN therapeutic range and for assessing the

## Executive summary

### Current knowledge on incorporating TPMT pharmacogenetics into clinical practice

- International guidelines recommend the use of pharmacogenetics for therapeutic management of thiopurines.
- Few data from large patient studies are available on the relationship between TPMT activity and thiopurine metabolite (6-thioguanine nucleotide [6-TGN] and 6-methylmercaptopurine nucleotide [6-MMPN]) profiles.
- Computational tool studies can contribute to strengthen routine biomarkers and provide an opportunity for developing new research programs.

### TPMT phenotype

- TPMT activity exhibited a 2.5-fold difference between the 5th and 95th percentile.
- TPMT activity distribution was not normal and four phenotypes were identified: low, intermediate, normal/high and very high.
- TPMT activity was slightly higher in males, children under 5 years of age and in cystic fibrosis patients, but this is probably not clinically relevant.

### TPMT genotype–phenotype concordance

- Wild-type patients had a 1.7- and 4.5-fold higher mean TPMT activity than did heterozygous and homozygous variant patients, respectively.
- The four major variant alleles (*TPMT*\*2, \*3A, \*3B and \*3C) accounted for 24% of the interindividual variability in TPMT activity.
- In this patient-based population, the overall genotype–phenotype concordance rate was 93.4%, with major discrepancies in the heterozygote genotypes, in which 26.7% of the patients were misclassified.
- Approximately 4.6% of the TPMT-deficient patients (low and intermediate phenotypes) carried none of the four major variant alleles and thus the negative predictive value of genotyping for detecting TPMT deficiency was 95.4%.

### Therapeutic drug monitoring experience

- More than 50% of the 6-TGN values in our database were below the lower limit of therapeutic range and 10% over the upper limit for toxicity.
- For 6-MMPN, approximately 9% of the concentrations were over the established threshold for hepatotoxicity.
- 6-TGN and 6-MMPN concentrations showed a poor correlation with each other.
- Of major interest, 6-MMPN concentrations were 1.6-fold higher in females than in males, whereas 6-TGN concentrations and azathioprine doses were similar.
- Females were approximately three-times more at risk to have an unfavorable ( $\geq 20$ ) 6-MMPN:6-TGN ratio.

### TPMT influence on 6-TGN & 6-MMPN metabolites

- 6-TGN concentrations were 1.6-fold higher in TPMT-deficient patients than in TPMT-normal patients and even 2.5-fold when normalized on azathioprine dose.
- 6-MMPN concentrations significantly increased across the intermediate, normal and very high TPMT patient groups.
- The 6-MMPN:6-TGN ratio was positively but weakly correlated with TPMT activity, suggesting that metabolite ratio is mainly determined by factors other than TPMT.
- In a multivariate mixed linear model in adult patients, azathioprine dose and *TPMT* genotype, but not phenotype, were associated with 6-TGN concentrations. For 6-MMPN, azathioprine dose, *TPMT* genotype and sex were the significant predictors of concentrations. These mixed linear models explained 41.7 and 50.2% of the concentration variances, respectively.



role of mono-, di- and tri-phosphate metabolites, in relation to clinical response, in order to better optimize and individualize thiopurine therapy. The strong sex effect for determining 6-MMPN concentrations and metabolite ratio should be clarified to improve the safety and the efficacy of thiopurine therapy.

### Author contributions

L Chouchana and M-A Lorient contributed to the conception, design and drafting of the article. C Narjoz and D Roche were involved in the data production. B Pineau and G Chatellier provided computational support for database setup. J-L Golmard contributed to linear mixed model analyses. P Beaune critically revised the paper. Final approval of the version to be published was obtained from all the authors.

### Financial & competing interests disclosure

This study was funded by the BioIntelligence collaborative program for the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM). The authors have no other relevant

affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

### Open access

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## References

Papers of special note have been highlighted as:

■ of interest

■ of considerable interest

- Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(1), 15–36 (2012).
- Broad review of thiopurine pharmacogenetics in inflammatory bowel disease.**
- Schwab M, Schäffeler E, Marx C *et al.* Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 12(6), 429–436 (2002).
- Ansari A, Hassan C, Duley J *et al.* Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16(10), 1743–1750 (2002).
- Marinaki AM, Ansari A, Duley JA *et al.* Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 14(3), 181–187 (2004).
- Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV *et al.* 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(4), 904–915 (2002).
- Discusses the metabolite ratio in therapeutic resistance of thiopurine.
- Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 50(4), 485–489 (2002).
- Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N *et al.* Thiopurine pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 20(9), 573–574 (2010).
- Wrobleva K, Kolorz M, Batovsky M *et al.* Gene polymorphisms involved in manifestation of leucopenia, digestive intolerance, and pancreatitis in azathioprine-treated patients. *Dig. Dis. Sci.* 57(9), 2394–2401 (2012).
- Gisbert JP, Gomollón F, Cara C *et al.* Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig. Dis. Sci.* 52(5), 1262–1269 (2007).
- Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 32(5), 651–662 (1980).
- Historical paper on autosomal codominant inheritance of TPMT activity.**
- Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126(8), 608–614 (1997).
- Appell ML, Berg J, Duley J *et al.* Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet. Genomics* 23(4), 242–248 (2013).
- Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(3), 387–391 (2011).
- Guidelines for the use of TPMT pharmacogenetics in clinical practice.**
- Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 93(4), 324–325 (2013).
- McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14(4), 567–572 (2000).
- Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br. J. Pharmacol.* 125(4), 879–887 (1998).
- Hindorf U, Appell ML. Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J. Crohns Colitis* 6(6), 655–659 (2012).
- Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D *et al.* Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype–genotype correlation in a large population of German–Caucasians and identification of

- novel *TPMT* variants. *Pharmacogenetics* 14(7), 407–417 (2004).
- **Large genotype–phenotype concordance analysis.**
  - 19 Yan L, Zhang S, Eiff B *et al.* Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype–phenotype correlation analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68(2), 210–219 (2000).
  - 20 Chouchana L, Narjoz C, Lorient MA. *TPMT* status determination: the simplest is the most effective? *J. Crohns Colitis* 6(7), 807 (2012).
  - 21 Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, Weinshilboum RM. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 2(4), 148–159 (1992).
  - 22 Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C *et al.* Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60(2), 89–96 (2004).
  - 23 Serpe L, Calvo PL, Muntoni E *et al.* Thiopurine *S*-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian–Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics* 10(11), 1753–1765 (2009).
  - **Large *TPMT* study on health subjects.**
  - 24 McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine *S*-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared with adults. *Pharmacogenetics* 5(5), 281–286 (1995).
  - 25 Hindorf U, Peterson C, Almer S. Assessment of thiopurine methyltransferase and metabolite formation during thiopurine therapy: results from a large Swedish patient population. *Ther. Drug Monit.* 26(6), 673–678 (2004).
  - **Relationship between *TPMT* and thiopurine metabolites.**
  - 26 Mircheva J, Legendre C, Soria-Royer C, Thervet E, Beaune P, Kreis H. Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 60(7), 639–642 (1995).
  - 27 Milek M, Karas Kuzelicki N, Smid A, Mlinaric-Rascan I. *S*-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 77(12), 1845–1853 (2009).
  - 28 Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* 53(5), 1051–1056 (1992).
  - 29 Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, Vora A. Thiopurine methyltransferase genotype–phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76(1), 125–136 (2013).
  - 30 Lennard L, van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41(1), 18–25 (1987).
  - 31 Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY *et al.* Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118(4), 705–713 (2000).
  - **Usefulness of thiopurine metabolite measurement in inflammatory bowel disease.**
  - 32 Reuther LO, Sonne J, Larsen NE *et al.* Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scand. J. Gastroenterol.* 38(9), 972–977 (2003).
  - 33 Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, Lorient MA. Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? *Clin. Chem.* 59(7), 1023–1026 (2013).
  - 34 Sparrow MP, Hande SA, Friedman S *et al.* Allopurinol safely and effectively optimizes thioguanine metabolites in inflammatory bowel disease patients not responding to azathioprine and mercaptopurine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(5), 441–446 (2005).
  - 35 van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML. High *TPMT* enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(10), 1181–1189 (2012).
  - 36 Dervieux T, Meyer G, Barham R *et al.* Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin. Chem.* 51(11), 2074–2084 (2005).
  - 37 Nguyen TV, Vu DH, Nguyen TM, Lachaux A, Bouliou R. Relationship between azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric IBD patients: identification of covariables using multilevel analysis. *Ther. Drug Monit.* 35(2), 251–257 (2013).
  - 38 Sandborn WJ. Rational dosing of azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 48(5), 591–592 (2001).
  - 39 Anglicheau D, Sanquer S, Lorient MA, Beaune P, Thervet E. Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic–phenotypic correlation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 773(2), 119–127 (2002).
  - 40 Sies C, Florkowski C, George P *et al.* Measurement of thiopurine methyltransferase activity guides dose-initiation and prevents toxicity from azathioprine. *NZ Med. J.* 118(1210), U1324 (2005).
  - 41 Dervieux T, Bouliou R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin. Chem.* 44(3), 551–555 (1998).
  - 42 van den Akker-van Marle ME, Gurwitz D, Detmar SB *et al.* Cost-effectiveness of pharmacogenomics in clinical practice: a case study of thiopurine methyltransferase genotyping in acute lymphoblastic leukemia in Europe. *Pharmacogenomics* 7(5), 783–792 (2006).
  - 43 Gurwitz D, Rodríguez-Antona C, Payne K *et al.* Improving pharmacovigilance in Europe: *TPMT* genotyping and phenotyping in the UK and Spain. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17(8), 991–998 (2009).
  - 44 van Egmond R, Barclay ML, Chin PKL, Sies CW, Florkowski CM. Biological variation of thiopurine methyltransferase enzyme activity: when has a significant change taken place? *Ann. Clin. Biochem.* 50(Pt 5), 473–478 (2013).
  - 45 Gardiner SJ, Gearry RB, Begg EJ, Zhang M, Barclay ML. Thiopurine dose in intermediate and normal metabolizers of thiopurine methyltransferase may differ three-fold. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6(6), 654–660 (2008).
  - 46 Chaparro M, Ordas I, Cabre E *et al.* Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 19(7), 1404–1410 (2013).
  - 47 Warman JI, Korelitz BI, Fleisher MR, Janardhanam R. Cumulative experience with short- and long-term toxicity to 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 37(3), 220–225 (2003).

## SUPPLEMENTARY TABLES

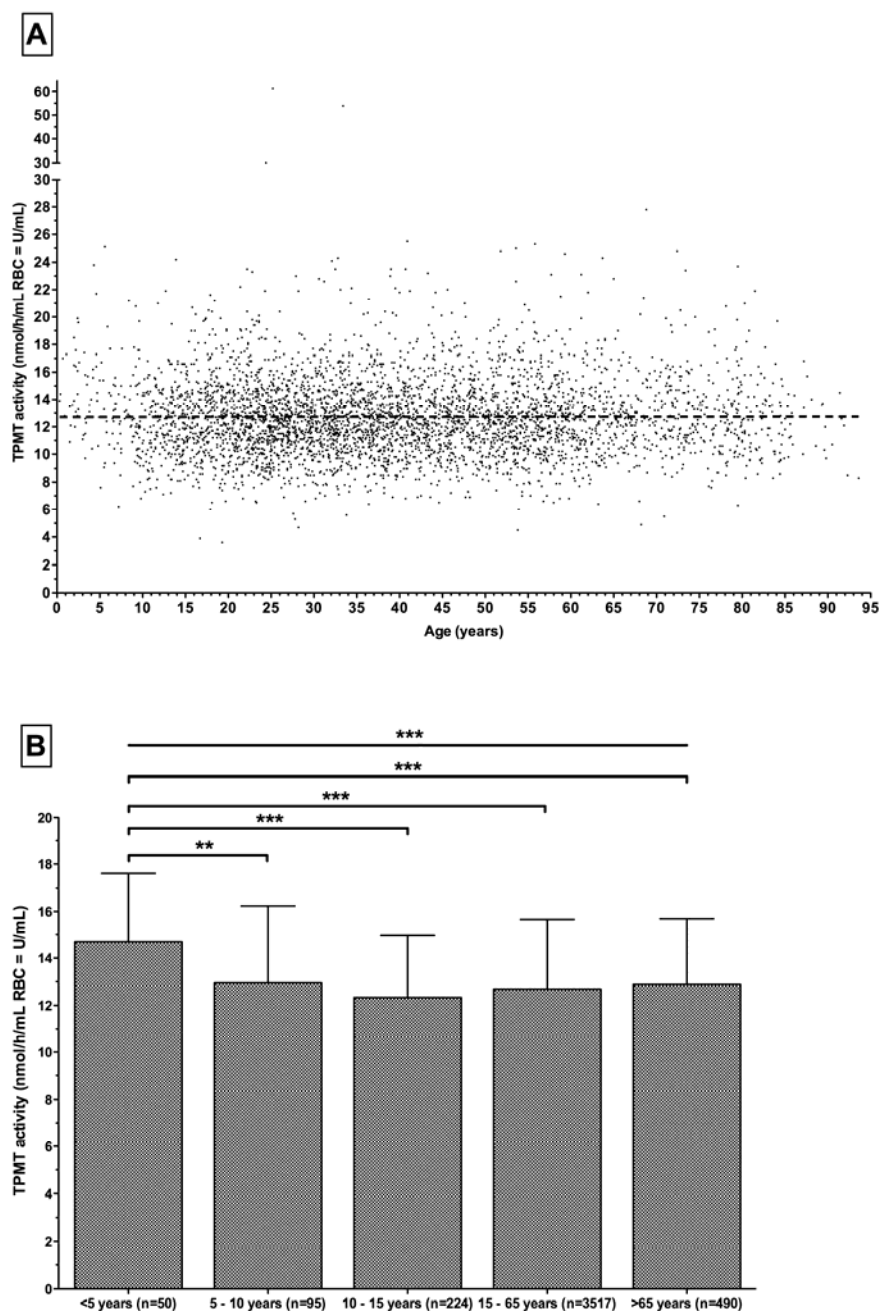
TPMT Allele	Count	Frequency [95% CI]
*1	9162	95.32% [94.90-95.75%]
*2	53	0.55% [0.41-0.70%]
*3A	295	3.07% [2.73-3.42%]
*3B	12	0.13% [0.06-0.20%]
*3C	90	0.93% [0.75-1.13%]
Total	9612	100.00%

### Supplementary Table 1. Counts and frequencies for wild-type and variant *TPMT* alleles in 4806 patients

TPMT, thiopurine *S*-methyltransferase; 95%CI, 95% confidence interval.

Genotyping was performed using allelic discrimination by PCR and did not allowed us to differentiate *\*1/\*3A* between *\*3B/\*3C*. However, on the basis of genotyping for the most frequent *TPMT* alleles and the level of enzyme activity, this group is certainly largely constituted by *\*1/\*3A* patients, even if we cannot exclude the presence of the very rare genotype *\*3B/\*3C*. In our population of 4911 patients, 105 patients were not genotyped because of missing consent for genetic analysis.

## SUPPLEMENTARY FIGURES



**Supplementary Figure 1. Correlations between TPMT activity and age in 4386 wild-type *TPMT* patients**

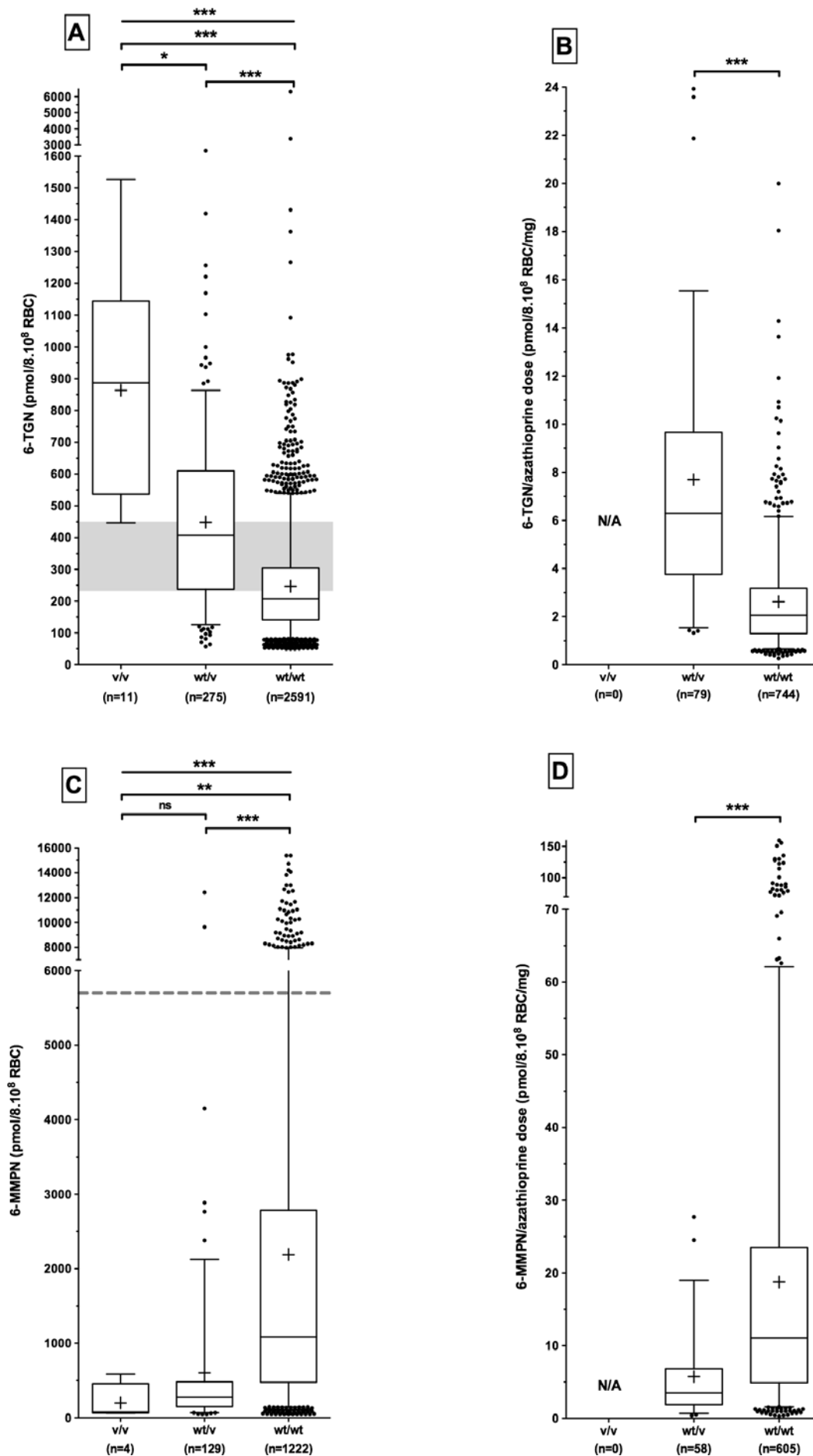
A. Influence of patient age on TPMT activity

B. TPMT activity according to patient age level

Dotted line represents linear regression between age and TPMT activity (non significant).

TPMT, thiopurine *S*-methyltransferase.

Kruskal-Wallis test, \*\*\*  $P < 0.0001$ , \*\*  $P < 0.01$



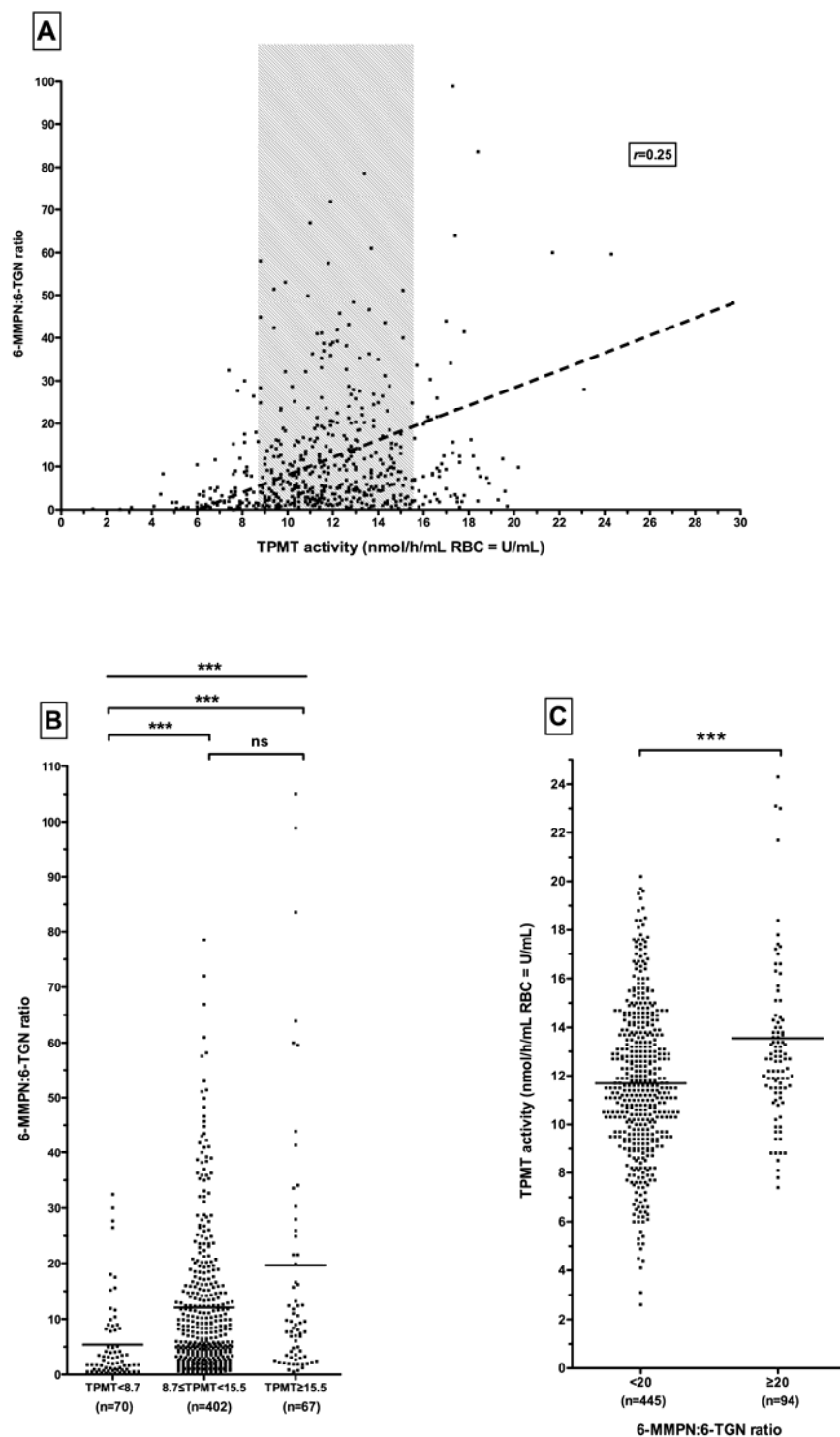
**Supplementary Figure 2. Variability in metabolite concentrations according to *TPMT* genotype**

- A. 6-TGN concentrations according to *TPMT* genotype
- B. 6-TGN concentrations per daily mg of azathioprine according to *TPMT* genotype
- C. 6-MMPN concentrations according to *TPMT* genotype
- D. 6-MMPN concentrations per daily mg of azathioprine according to *TPMT* genotype

Boxes and whiskers include data between the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles and the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentile, respectively. Outliers are depicted as dots, median values as solid lines, and mean values as solid crosses. The gray box represents the therapeutic range [235-450 pmol/8·10<sup>8</sup> RBC] for 6-TGN. The dotted gray line represents the cutoff (5,700 pmol/8·10<sup>8</sup> RBC) above which 6-MMPN is associated with hepatotoxicity.

*TPMT*, thiopurine *S*-methyltransferase; RBC, red blood cells; v, variant; wt, wild-type; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMPN, 6-methylmercaptopurine nucleotides; N/A, no data available.

Kruskal-Wallis test, \*\*\*  $P < 0.0001$ , \*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$



**Supplementary Figure 3. Correlations between TPMT activity and metabolite (6-MMPN:6-TGN) ratio**

A. Influence of TPMT activity on 6-MMPN:6-TGN ratio

B. 6-MMPN:6-TGN metabolite ratio according to TPMT phenotype

C. TPMT activity in favorable (<20) and unfavorable (≥20) 6-MMPN:6-TGN metabolite ratio

TPMT, thiopurine *S*-methyltransferase; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMPN, 6-methylmercaptopurine nucleotides.

Dotted red line represents Spearman correlation between TPMT activity and metabolite ratio ( $r=0.25$ ). Mean values are depicted as solid lines.

Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test, \*\*\*  $P<0.001$





## Article 3

---

### **Etudes d'association sur phénomène entier à partir d'une variable quantitative : application à l'activité TPMT et aux traitements par thiopurines en pharmacogénomique**

Antoine Neuraz <sup>1,2</sup>, Laurent Chouchana <sup>3</sup>, Georgia Malamut <sup>4</sup>, Christine Le Beller <sup>5</sup>, Denis Roche <sup>6</sup>, Philippe Beaune <sup>3,6</sup>, Patrice Degoulet <sup>1,2</sup>, Anita Burgun <sup>1,2</sup>, Marie-Anne Loriot <sup>3,6</sup>, Paul Avillach <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Biomedical informatics and public health department, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France*

<sup>2</sup> *INSERM UMR\_S 872 team 22: Information Sciences to support Personalized Medicine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de médecine, Paris, France*

<sup>3</sup> *INSERM UMR-S 775, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France*

<sup>4</sup> *Gastroenterology Department, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France*

<sup>5</sup> *Pharmacovigilance Center, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France*

<sup>6</sup> *Biochemistry, pharmacogenetics and molecular oncology unit, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France*

### **Contexte**

A l'ère du *big data* (données massives) dans le domaine de la biologie et de la santé [ANONYME 2008], l'utilisation des données produites par nos systèmes de soins dans une perspective de recherche clinique est une opportunité pour tester « à moindre coût » des hypothèses ou développer de nouveaux programmes de recherche [FRANKOVICH *et al.* 2011]. La conduite d'études pharmacogénomiques *in silico* nécessite une informatisation intégrée des systèmes de santé, notamment des hôpitaux ou des caisses d'assurance maladie.

- Dossier patient informatisé

Les technologies de l'information dans le secteur de la santé ont fait leur apparition dans les années 80 avec la mise en place de Systèmes d'information hospitaliers (SIH) dans le but de faciliter le partage des informations nécessaires tant au suivi individuel de chaque patient, qu'au pilotage collectif du système de santé. L'élément de base des SIH pour la prise en charge du patient est le dossier patient informatisé (*electronic health record*, EHR). Un état des lieux des SIH, publié en 2014 par la Direction générale de l'offre de soins (Ministère de la Santé), rapporte que 79 % des établissements de santé en France disposent d'EHR [DGOS 2014]. L'EHR reste cependant incomplet et il est alimenté par les résultats de biologie dans seulement 54 % des établissements. Par contre, concernant les prescriptions médicamenteuses, elles sont informatisées dans 73 % des établissements en moyenne.

Dans les structures où l'informatisation du dossier patient est la plus aboutie, ce dernier comporte le dossier médical avec notamment les comptes rendus d'hospitalisation, le dossier de soins contenant les plans de soins à jour, les résultats d'analyses biologiques, les prescriptions médicamenteuses et les résultats d'imagerie. Les objectifs de l'EHR sont multiples. En premier lieu, il favorise une meilleure coordination des soins. Outil de partage des informations, il constitue un élément clé de la qualité, de la traçabilité et de la continuité des soins dans le cadre d'une prise en charge pluri-professionnelle et pluridisciplinaire. Alors que le dossier papier révélait un cloisonnement des informations, l'EHR permet le regroupement des informations « administratives », médicales et paramédicales, conformément au décret du 30 mars 1992 (Décret n°92-329 relatif au dossier médical et à l'information des personnes accueillies dans les établissements de santé publics et privés). Ensuite, de par l'absence de retranscription, l'EHR diminue les risques d'erreurs et d'insécurité des informations. Par ailleurs, l'EHR peut comporter des aides automatisées à la prise de décision, notamment des aides à la prescription en fonction du résultat d'un test pharmacogénétique ou biologique. Enfin, l'EHR a montré qu'il permettait d'améliorer la sécurité des prescriptions médicamenteuses et de faire des économies en diminuant les hospitalisations en lien avec des erreurs médicamenteuses [ZLABEK *et al.* 2011]. A titre d'exemple, une récente étude portant sur l'analyse des dossiers médicaux de plus de 160 000 patients diabétiques avant et après informatisation, a montré que l'EHR permet de réduire le nombre d'hospitalisations et de visites aux urgences [REED *et al.* 2013].

Les EHR se sont notamment développés *via* la nécessité de la mise en place par les hôpitaux d'un Programme médicalisé des systèmes d'information (PMSI), afin d'analyser leur activité médicale et de transmettre aux services de l'État et à l'Assurance maladie « les informations relatives à leurs moyens de fonctionnement et à leur activité » [ATIH]. Ainsi, le séjour de chaque patient est codé en terme de diagnostic principal et de diagnostics secondaires selon la 10<sup>ème</sup> Classification Internationale des Maladies (CIM-10 ou *International Classification Diseases*, ICD-10) de l'OMS [OMS]. Les données accumulées au sein des EHR peuvent aussi être utilisées à des fins collectives, comme participer à la gestion des dépenses de santé ou à l'évaluation de la qualité des soins dans le cadre de protocoles de recherche clinique.

- Entrepôt de données cliniques

Les EHR devraient permettre de faciliter la recherche clinique, notamment dans le domaine de la pharmacogénétique [PATHAK *et al.* 2013]. Cependant, un des verrous de l'exploitation des données clinico-biologiques produites au cours du soin, malgré leur informatisation, provient de leur caractère hétérogène et du cloisonnement des bases de données qui les hébergent. L'entrepôt de données cliniques (*clinical data warehouse*, CDW) est un outil qui permet de colliger l'ensemble de ces informations (données administratives, médicales, de soins, biologiques, thérapeutiques, imagerie) au sein d'une seule et même base de données. Il est associé à des outils d'exploitation à destination des chercheurs et des cliniciens. L'utilisation des données de soins pour la recherche clinique est ainsi facilitée par la mise à disposition d'un CDW [DENNY 2012]. Les CDW sont quasiment en permanence alimentés par de nouvelles données produites par les systèmes de santé. Ils nécessitent une anonymisation totale des données à l'aide d'un identifiant patient unique permettant l'interopérabilité entre les différentes bases de données [ZAPLETAL *et al.* 2010b]. La consultation d'informations provenant de différentes bases de données (par exemple en croisant des données cliniques et thérapeutiques) est généralement soumise à l'approbation d'un comité d'éthique. Ainsi, l'intérêt majeur d'un CDW est la possibilité de débiter une étude à l'aide de n'importe quel critère d'entrée (clinique, biologique, thérapeutique...).

Aux Etats-Unis, un réseau de neuf hôpitaux universitaires a mis en place le consortium *electronic Medical Records and Genomics* (eMERGE) [GOTTESMAN *et al.* 2013; MCCARTY *et al.*

2011]. Les CDW permettent de phénotyper, *i.e.* de caractériser cliniquement, des patients à l'aide des données structurées présentes dans les EHR [WILKE *et al.* 2011]. Les avancées récentes dans le domaine du traitement automatique du langage naturel (*natural language processing*, NLP) permettent d'exploiter les données non structurées, *i.e.* en texte libre, et d'avoir une reconstitution précise de l'historique d'un patient, notamment en termes d'exposition aux médicaments [XU *et al.* 2010]. Ainsi, le réseau eMERGE a permis l'identification de grandes cohortes de patients sur la base de critères « phénotypiques », *i.e.* cliniques, combinés pour la mise en place d'études génomiques. En France, l'HEGP (AP-HP) à Paris est l'un des premiers hôpitaux à s'être doté d'un CDW [ZAPLETAL *et al.* 2010b]. Le développement de ce CDW est le résultat d'une quinzaine d'années d'EHR et a permis de colliger des données sur plus de 1,2 millions de patients.

Cependant, le fait que les EHR aient été conçus en premier lieu pour le soin et non pour la recherche peut présenter des limites à leur utilisation en recherche clinique. En effet, la réutilisation des données pour la recherche est parfois difficile et nécessite des précautions. Tout d'abord, ce sont des données rétrospectives, et donc « éparses », dont la disponibilité n'est pas la même pour tous les patients. Ensuite les EHR, bien que reflétant la pratique courante, contiennent parfois des données imprécises, fausses ou incomplètes, dans la mesure où elles n'ont pas été renseignées avec la méthodologie et la qualité propre aux essais cliniques [SCHEUNER *et al.* 2009]. Ces données ne sont pas toujours de bonne qualité, cette dernière diminuant également du fait qu'elles sont renseignées par un nombre d'intervenants distincts importants. Cependant, il a été observé qu'une fois que les cliniciens sont sensibilisés à l'intérêt des EHR pour leurs propres travaux de recherche, ils tendent à améliorer la qualité et la précision des annotations cliniques [KOHANE 2011]. Il y a donc un bénéfice secondaire de l'utilisation des EHR en recherche clinique sur la qualité de ces derniers. Enfin, les EHR contiennent une quantité immense de données narratives non structurées – texte libre – telles que les observations médicales, les comptes rendus d'hospitalisation ou les résultats d'examen d'imagerie [DENNY 2012]. Ce dernier point représente probablement le plus grand défi pour le développement des recherches sur EHR dans les années à venir. Ainsi des méthodes de NLP se développent avec l'aide de linguistes, pour structurer ces notes en texte narratif et en extraire les informations utiles [SHIVADE *et al.* 2014].

### **Objectifs et méthodologie**

Ce travail de recherche est issu d'une collaboration avec le service d'Informatique hospitalière de l'HEGP. A l'issu de la précédente étude sur la base de données pharmacogénétiques, nous avons voulu évaluer l'impact des phénotypes TPMT sur le devenir clinico-biologique des patients en utilisant un outil bio-informatique novateur disponible à l'HEGP : le CDW. Pour cela, une méthodologie originale a été utilisée, fondée sur la méthode des PheWAS. A partir d'une variable quantitative (activité TPMT) transformée en classes (phénotypes TPMT), nous avons individualisé deux groupes de patients – activité TPMT très élevée vs. toutes les autres activités TPMT – afin de comparer leur phénomène, *i.e.* l'ensemble des diagnostics cliniques de la classification CIM-10 observés durant toute la période de suivi disponible dans le CDW. Le PheWAS est en fait une succession d'études cas-témoin : pour chaque diagnostic CIM-10 (les cas), le nombre de patients présentant le facteur de risque (activité TPMT très élevée) est compté puis comparé au nombre de patients présentant ce risque parmi l'ensemble des autres diagnostics (les témoins). La définition des témoins ne prend pas en compte les diagnostics connexes dans la classification CIM-10, ces derniers étant trop proches du diagnostic caractérisant un cas et pouvant ainsi induire un biais. Le niveau de la précision des diagnostics CIM-10 – entre 22 et 14 400 diagnostics en fonction de la super-classe ou classe choisie pour l'analyse – est définie par rapport au nombre de patients disponibles. Par extension, nous avons également analysé les résultats des analyses biologiques avec la même méthodologie cas-témoin en identifiant une valeur seuil pour chaque variable biologique définissant les cas des témoins. Par ailleurs, afin d'évaluer l'effet d'un traitement par thiopurine en fonction de la présence d'un facteur de risque, la temporalité a été prise en compte, c'est-à-dire que l'analyse a été restreinte aux périodes postérieures à la date estimée du de l'initiation du traitement. Enfin, nous avons confronté les diagnostics cliniques aux résultats biologiques.

### **Principaux résultats et discussion**

Un total de 554 patients éligibles a été identifié, parmi lesquels 442 ont finalement été inclus dans l'étude PheWAS, car ayant dans leur EHR la présence de diagnostics CIM-10, d'une détermination de l'activité TPMT, et d'une notion de traitement par thiopurines.

L'analyse a révélé que la présence d'une activité TPMT très élevée était significativement associée, après corrections des tests multiples, avec les diagnostics de « diabète » et « anémie nutritionnelle ». Ces résultats sont confirmés par l'analyse des résultats biologiques qui établit une association avec une hyperglycémie et une anémie. Le diagnostic « hypertension artérielle secondaire » a également été retrouvé mais la significativité ne dépassait pas le seuil de correction pour tests multiples. De plus, nous avons vérifié à l'aide d'une analyse de survie que l'anémie n'était pas préexistante et survenait bien au cours du traitement par thiopurine en fonction de la présence du facteur de risque (activité TPMT très élevée). Enfin, l'analyse des données non structurées majoritairement dans les comptes rendus d'hospitalisation, a révélé plus de patients en échec thérapeutique parmi le groupe ayant une activité TPMT très élevée par rapport au groupe de patients ayant une activité TPMT autre.

Nos résultats suggèrent fortement qu'il existe chez les patients avec une activité TPMT très élevée, la présence de signes de saignements, possiblement en lien avec une maladie active. En outre, ces patients ont dans leur historique plus de diagnostics associés à des traitements prolongés par corticoïdes. Nous faisons alors l'hypothèse que les patients ayant une activité TPMT très élevée ont plus de rechutes de leur MICI, nécessitant un recours plus fréquent et plus prolongé aux corticoïdes – traitement de référence dans les poussées inflammatoires – que les autres patients. Ainsi, ces patients avec une activité TPMT très élevée bénéficient très probablement d'une moins bonne efficacité thérapeutique sous thiopurines.

Cette étude a montré pour la première fois la faisabilité et l'intérêt d'effectuer un PheWAS sur une variable quantitative pharmacogénomique. Les études sur CDW permettent de définir de nouvelles hypothèses de recherche, fondées sur des données de soins courants, qui devront être validées ensuite par des études cliniques prospectives.

**Article publié dans *PLoS Computational Biology* (cf. pages suivantes)**

**« Phenome-wide association studies on a quantitative trait: application to TPMT enzyme activity and thiopurine therapy in pharmacogenomics »**

Neuraz A, Chouchana L, Malamut G, Le Beller C, Roche D, Beaune P, Degoulet P, Burgun A, Lorient MA, Avillach P. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(12):e1003405.

*Impact factor : 4,9*

# Phenome-Wide Association Studies on a Quantitative Trait: Application to TPMT Enzyme Activity and Thiopurine Therapy in Pharmacogenomics

Antoine Neuraz<sup>1,2</sup>, Laurent Chouchana<sup>3</sup>, Georgia Malamut<sup>4</sup>, Christine Le Beller<sup>5</sup>, Denis Roche<sup>6</sup>, Philippe Beaune<sup>3,6</sup>, Patrice Degoulet<sup>1,2</sup>, Anita Burgun<sup>1,2</sup>, Marie-Anne Lorient<sup>3,6</sup>, Paul Avillach<sup>1,2\*</sup>

**1** Biomedical Informatics and Public Health Department, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France, **2** INSERM UMR\_S 872 Team 22: Information Sciences to support Personalized Medicine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France, **3** INSERM UMR-S 775, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **4** Gastroenterology Department, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France, **5** Pharmacovigilance Center, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France, **6** Biochemistry, Pharmacogenetics and Molecular Oncology Unit, University Hospital HEGP, AP-HP, Paris, France

## Abstract

Phenome-Wide Association Studies (PheWAS) investigate whether genetic polymorphisms associated with a phenotype are also associated with other diagnoses. In this study, we have developed new methods to perform a PheWAS based on ICD-10 codes and biological test results, and to use a quantitative trait as the selection criterion. We tested our approach on thiopurine 5-methyltransferase (TPMT) activity in patients treated by thiopurine drugs. We developed 2 aggregation methods for the ICD-10 codes: an ICD-10 hierarchy and a mapping to existing ICD-9-CM based PheWAS codes. Eleven biological test results were also analyzed using discretization algorithms. We applied these methods in patients having a TPMT activity assessment from the clinical data warehouse of a French academic hospital between January 2000 and July 2013. Data after initiation of thiopurine treatment were analyzed and patient groups were compared according to their TPMT activity level. A total of 442 patient records were analyzed representing 10,252 ICD-10 codes and 72,711 biological test results. The results from the ICD-9-CM based PheWAS codes and ICD-10 hierarchy codes were concordant. Cross-validation with the biological test results allowed us to validate the ICD phenotypes. Iron-deficiency anemia and diabetes mellitus were associated with a very high TPMT activity ( $p=0.0004$  and  $p=0.0015$ , respectively). We describe here an original method to perform PheWAS on a quantitative trait using both ICD-10 diagnosis codes and biological test results to identify associated phenotypes. In the field of pharmacogenomics, PheWAS allow for the identification of new subgroups of patients who require personalized clinical and therapeutic management.

**Citation:** Neuraz A, Chouchana L, Malamut G, Le Beller C, Roche D, et al. (2013) Phenome-Wide Association Studies on a Quantitative Trait: Application to TPMT Enzyme Activity and Thiopurine Therapy in Pharmacogenomics. *PLoS Comput Biol* 9(12): e1003405. doi:10.1371/journal.pcbi.1003405

**Editor:** Donna K. Slonim, Tufts University, United States of America

**Received:** May 31, 2013; **Accepted:** November 8, 2013; **Published:** December 26, 2013

**Copyright:** © 2013 Neuraz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was partly funded by the BioIntelligence collaborative program for the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: paul.avillach@egp.aphp.fr

## Introduction

The US National Research Council report “Toward Precision Medicine” proposed the redefinition of diseases using the underlying molecular causes and other factors in addition to traditional signs and symptoms [1]. To establish the relationships between molecular characterization and clinical features, different methods have been proposed [2]. Genome Wide Association Studies (GWAS) have allowed the identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with a determinate phenotype [3–5]. (Figure S1 Panel A) Between 2005 and June 2012, 1,350 GWAS were published [6]. In 2010, Denny *et al.* described another method called Phenome-Wide Association Study (PheWAS) [7]. PheWAS investigates whether the SNPs associated with a phenotype are also associated with other diagnoses (Figure S1 Panel B) [7,8]. Therefore, for a selected SNP, two groups are composed: one with a specific allele and a control group with other alleles. Thereafter, to search for new associations, all of the phenotypic data (for example, all International Classification of Diseases (ICD) codes) available in

the medical records of the patients having the specific allele are screened and compared to those of the control group [9]. Denny *et al.* genotyped 6,000 patients in the BioVU data bank at five SNPs with previously reported disease associations and ran a PheWAS on each SNP, based on the ICD-9-CM codes [7,10]. They replicated four out of seven known molecular-clinical associations and discovered 19 new potential associations.

Following this example, further PheWAS were performed on the SNPs associated with hypothyroidism (*FOXE1*) [8], rheumatoid arthritis [11], and on HLA-DRB1\*1501, which has been linked to several autoimmune diseases [12]. Most PheWAS were performed with data collected through the Electronic Medical Records and Genomics (eMERGE) network, including the Marshfield Clinic’s Personalized Medicine cohort [13]. With the aim of analyzing the genetic architecture of complex traits and identifying new pleiotropic relationships, Pendergrass *et al.* conducted a PheWAS on 70,061 study participants representing four major racial/ethnic groups in the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) network [14,15].



## Author Summary

The use of underlying molecular mechanisms and other factors to describe and classify diseases is a major challenge for future treatment strategies. New methods are needed to achieve this goal. The phenome wide association study (PheWAS) methodology was initially developed to unveil unknown associations between a specific genetic status and phenotypic features (e.g. diagnoses from electronic health records). We initially propose to extend this method to assessment of the relationships between the levels of a quantitative trait and diagnosis codes. We also assess the relationships between this quantitative trait and the biological test results. We tested this method using the levels of enzymatic activity of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) that is involved in the metabolism of thiopurine drugs used in inflammatory bowel diseases for example. We discovered an association between a very high TPMT activity and nutritional anemia and diabetes. These results could be used to describe a new subgroup of patients in order to optimize drug treatments.

Analyses combining GWAS and PheWAS have been reported: whereas GWAS allows researchers to identify a genomic region of interest or one SNP associated with a clinical condition, PheWAS identifies all the diagnoses potentially associated with these markers. For example, Denny *et al.* performed a GWAS for primary hypothyroidism and, afterwards a PheWAS on 13,617 patient records, based on the locus that was previously identified. Thus, genetic associations with thyroiditis and thyrotoxicosis but neither Graves or thyroid cancer have been highlighted [8]. More recently, Ritchie *et al.* performed genome- and phenome-wide analysis on cardiac conduction, which resulted in the identification of new markers for atrial fibrillation and arrhythmia [16].

To perform a PheWAS, a large amount of data must be included to infer potential patterns and discover new possible associations [17,18]. The criterion for data selection includes the presence of a particular genotype. A cohort containing all types of diagnoses is necessary to discover some new potential associations. Clinical Data Warehouses (CDWs) have been developed to allow the integration of Electronic Health Records (EHRs) data and their use for research; they can also be used as data source for such studies [19–22]. When linked to DNA repositories, CDWs are a source of patient data to analyze the relationship between genetic variations and human traits [23–26].

Instead of directly using genomic data as the inclusion criteria, it is possible to use a quantitative trait (e.g., biological test results) [27]. This approach presents three advantages: (i) quantitative traits are usually recorded as part of the clinical data; (ii) a quantitative trait, consisting of both genetic variations and non-genetic factors can more accurately describe a clinical feature than genetic mutations alone; (iii) quantitative traits can be highly correlated to a genomic status. This is the case for thiopurine S-methyltransferase (TPMT), a key enzyme involved in thiopurine metabolism, as TPMT activity is highly correlated to the genotypes of individuals [28–30].

Thiopurine drugs (azathioprine, 6-thioguanine and 6-mercaptopurine) are frequently prescribed in autoimmune disorders, such as inflammatory bowel disease (IBD), or in blood cancers, such as acute lymphoblastic leukemia [29,31]. Severe adverse effects occur in 15% to 28% of the treated patients, and up to 40% of IBD patients are resistant to thiopurines [29,32,33]. The production of active metabolites, such as the 6-thioguanine nucleotides (6-TGN),

is largely regulated by TPMT [33,34]. Genetic polymorphisms of TPMT result in a trimodal distribution of TPMT activity (TPMTa). Whereas a large majority, approximately 89%, of the population show normal activity (nTPMTa), approximately 11% have a partially deficient activity level, and 0.3% have a completely deficient activity level [30,35,36]. Moreover, among patients with nTPMTa, approximately 15% show a very high TPMTa (vhTPMTa) [29,37].

In treated patients, there is a negative correlation between partial or completely deficient TPMTa, and high 6-TGN intra-erythrocyte concentrations, resulting in severe hematological toxicities or even lethal bone marrow suppression [34]. Conversely, patients with vhTPMTa are more prone to low 6-TGN intra-erythrocyte concentrations and pharmacological resistance to thiopurines [38]. Therefore, to detect patients at high risk of severe hematological toxicities, the US Food and Drug Administration (FDA) and the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) strongly recommend that TPMT status be determined either by genotyping or phenotyping prior to initiation of thiopurine therapy [30]. Based on these observations, TPMTa levels can be used as a starting point for a PheWAS.

## Objectives

We aimed to develop methods to perform a PheWAS based on the ICD-10 codes and biological test results, while using a quantitative trait as a selection criterion. We then tested our approach on a specific quantitative trait, TPMTa, in order to identify new subgroups of patients with different characteristics.

## Materials and Methods

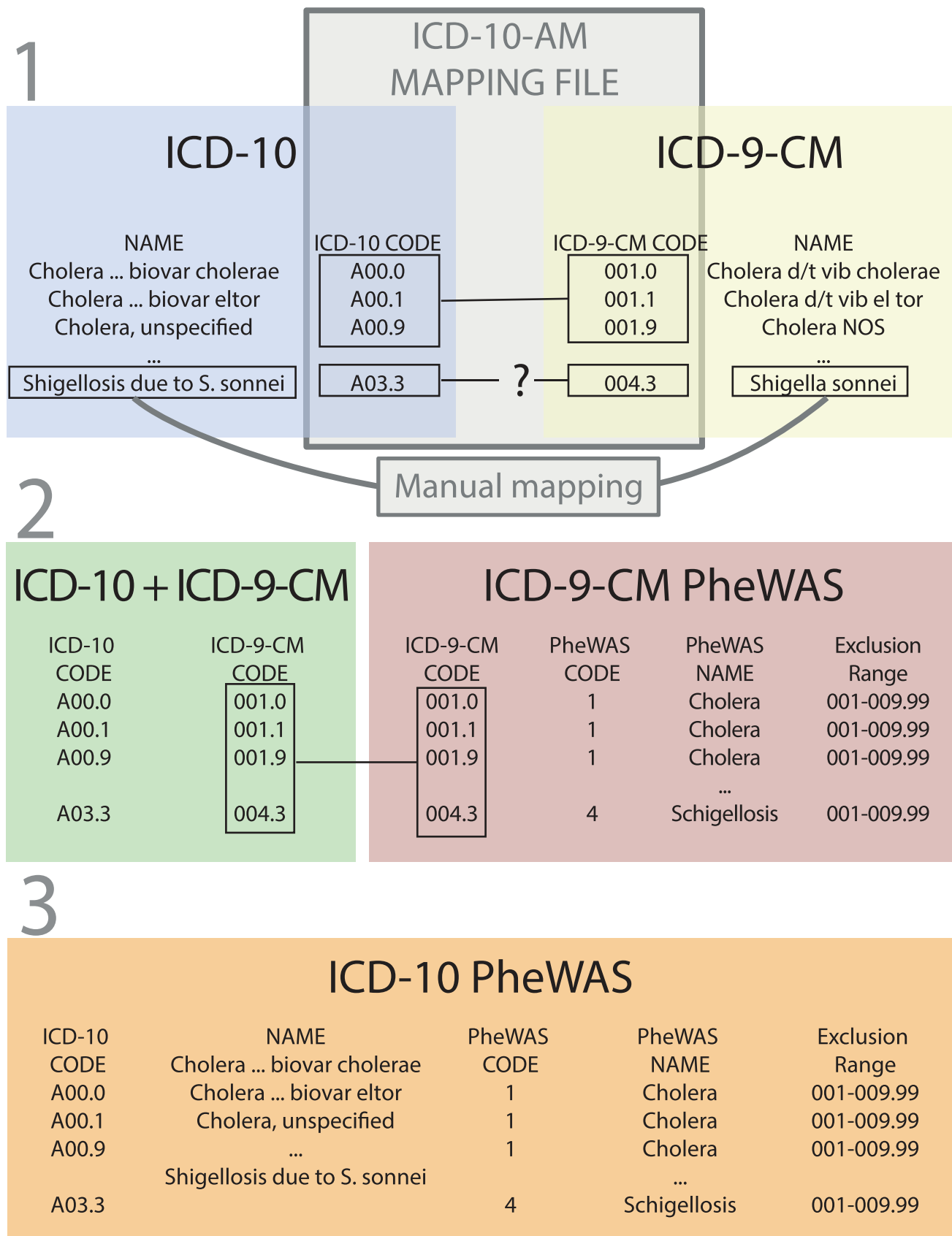
### Study and clinical data warehouse

We performed an *in silico* retrospective case-control study using data from an academic hospital, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP) in Paris, France. We extracted data from HEGP CDW, an i2b2 CDW containing more than 606,524 single patients, collected between 2000 and 2012 [20,39]. This CDW contains routine care data divided into nine categories (208,955,369 items): demographics (age, sex, and hospital vital status), vital signs (e.g., temperature, blood pressure, weight...), diagnoses (ICD-10), procedures (French CCAM classification), clinical data (structured questionnaires from EHR), free text reports, pathology codes (French ADICAP classification), biological test results, and Computerized Provider Order Entry (CPOE) drug prescriptions.

### Definition of ICD-10 PheWAS codes: Two aggregation levels

ICD codes could not be directly used for analysis because of their fine granularity. Therefore, we developed two different aggregation methods.

**ICD-9-CM mapping PheWAS codes.** The first aggregation scale relies on mapping between ICD-9-CM and ICD-10 [40]. We extracted the ICD-10 classification from the United Medical Language System (UMLS) [41]. Then, we used a mapping file developed by the New Zealand Ministry of Health to map the ICD-10 codes to the ICD-9-CM codes (Figure 1) [40]. After format adaptations, 99.5% of the codes were mapped successfully. The 57 remaining codes were mapped manually. This allowed us to use the ICD-9-CM PheWAS codes from Denny *et al.* [42] These ICD-9-CM PheWAS codes contained 829 different codes including 771 used for analysis. Codes that were not a proper diagnosis were excluded (e.g. “Effects of air pressure caused by explosion”).



**Figure 1. Three steps terminology construction, from PheWAS codes based on ICD-9-CM to PheWAS codes based on ICD-10 using ICD-9-CM-A to ICD-10-AM mapping file and manual mapping.** PheWAS: Phenome-wide association study; ICD: International classification of diseases; ICD-9-CM: International classification of diseases clinically modified; ICD-9-CM-A: Australian version of the ICD-9-CM, with custom codes added. ICD-10-AM: Australian version of the ICD-10, with custom codes added. 1: Mapping file from the New-Zealand Ministry of Health was used to project ICD-10 codes on ICD-9-CM. 2: Mapping of the previous projection with existing ICD-9-CM PheWAS codes. 3: File with correspondence between ICD-10 codes and ICD-9-CM PheWAS codes.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g001

**ICD-10 PheWAS codes.** The other grouping method was based on the ICD-10 hierarchy. Given the size of our sample population, a lower level of granularity was more relevant. We used the superclasses of the three digit codes, leading to 257 groups. ICD-10PheWAS codes and ICD-10 to ICD-9-CM PheWAS codes mapping files are available for download here: [http://umrs872eq22.com/TPMT\\_PLOS/Phewas\\_codes\\_ICD10\\_ICD9.zip](http://umrs872eq22.com/TPMT_PLOS/Phewas_codes_ICD10_ICD9.zip)

### ICD codes analyses

Groups of patients were divided according to the quantitative trait studied. (Figure 2) Then, as described by Denny *et al.*, for each PheWAS code, a case-control comparison was performed: (i) the case group was generated with patients having an ICD code in the range of this PheWAS code; (ii) the control group was composed of patients without any ICD code in this range; and (iii) patients with ICD codes that were too close to those of the current PheWAS code were excluded from this specific comparison. For each PheWAS code, its siblings were used as exclusion ranges. For example: for grouped codes under C15–26 (Malignant neoplasms, digestive organs), the exclusion range was from C00 to D48 (Neoplasms). We successively used the two methods of ICD code aggregation to compare the distribution of cases between the groups.

### Biological test result analyses

For each biological test, we used thresholds to define low-value cases and high-value cases, according to the normal value range (Table 1). Because patients had more than one occurrence of each biological test, two algorithms of analyses were applied. The first was a “global approach” in which a high-value case (resp. a low-value case) was defined as the presence of at least one test result above the high threshold (resp. below the low threshold). (Figure S2) In addition, for hyperglycemia, we required two occurrences above the high threshold. (Table S1) The proportions of cases among patient groups were then compared, similar to the ICD analysis. The second method was a “frequency based approach” in which a case was defined by one encounter with at least one result either below (low-value cases) or above (high-value cases) the thresholds. (Figure S2) The proportions of encounter cases (“episodes”) per patient for a test were compared, similar to the ICD analysis. The results of the “global approach” and of the “frequency-based approach” were analyzed in view of the ICD-based findings.

For biological tests significantly associated to a TPMTa group, we performed an event-free Kaplan-Meier survival analysis (*i.e.* low-value event or high-value event) after initiation of thiopurine therapy, excluding events occurring within the first week of treatment. Analysis was censored to 360 days after initiation of thiopurine therapy.

### Application to TPMT enzyme activity

**Population.** We selected all the patients who underwent a TPMTa assay and with at least one ICD-10 code or one biological test result between January 2000 and July 2013, *i.e.* *TPMT cohort*. For the PheWAS analysis, we included the patients having a notion of thiopurine treatment in their EHR and kept ICD codes

and biological test results dated after the starting of thiopurine treatment. There were no exclusion criteria. We will refer to this group as the *study population*.

We first compared the characteristics of the *TPMT cohort* to a hospital control group composed of randomly selected patients among the HEGP CDW who did not undergo a TPMTa assessment and were matched for year of birth and sex (3 for each patient in the *TPMT cohort*).

Then, we split the initial *TPMT cohort* into three groups according to TPMTa level: (i) low TPMTa (lowTPMTa) combining both partial and completely deficient TPMTa patients, with an activity below 8.5 nmol/h/mL red blood cells (RBC); (ii) nTPMTa; and (iii) vhTPMTa, with an activity above 15.0 nmol/h/mL RBC [43]. We have assessed that TPMTa is stable over time from the patients ( $n = 51$ ) who underwent more than one TPMTa assay (Table S2). For these patients, only the first measurement was used in the analyses.

**Data management.** An open database connection (ODBC) linking an Oracle database (11 g Enterprise Edition Release 11.2.0.1.0) of i2b2 CDW (version 1.3) to R software (version 2.15.3) was set up. The dataset containing data from the *TPMT cohort* (demographic, diagnoses, free text reports, structured questionnaires, biological tests results and drug prescriptions) was imported into R. All further analyses were carried out in R, using the RODBC 1.3–6 and the ggplot2 0.9.3.1 packages.

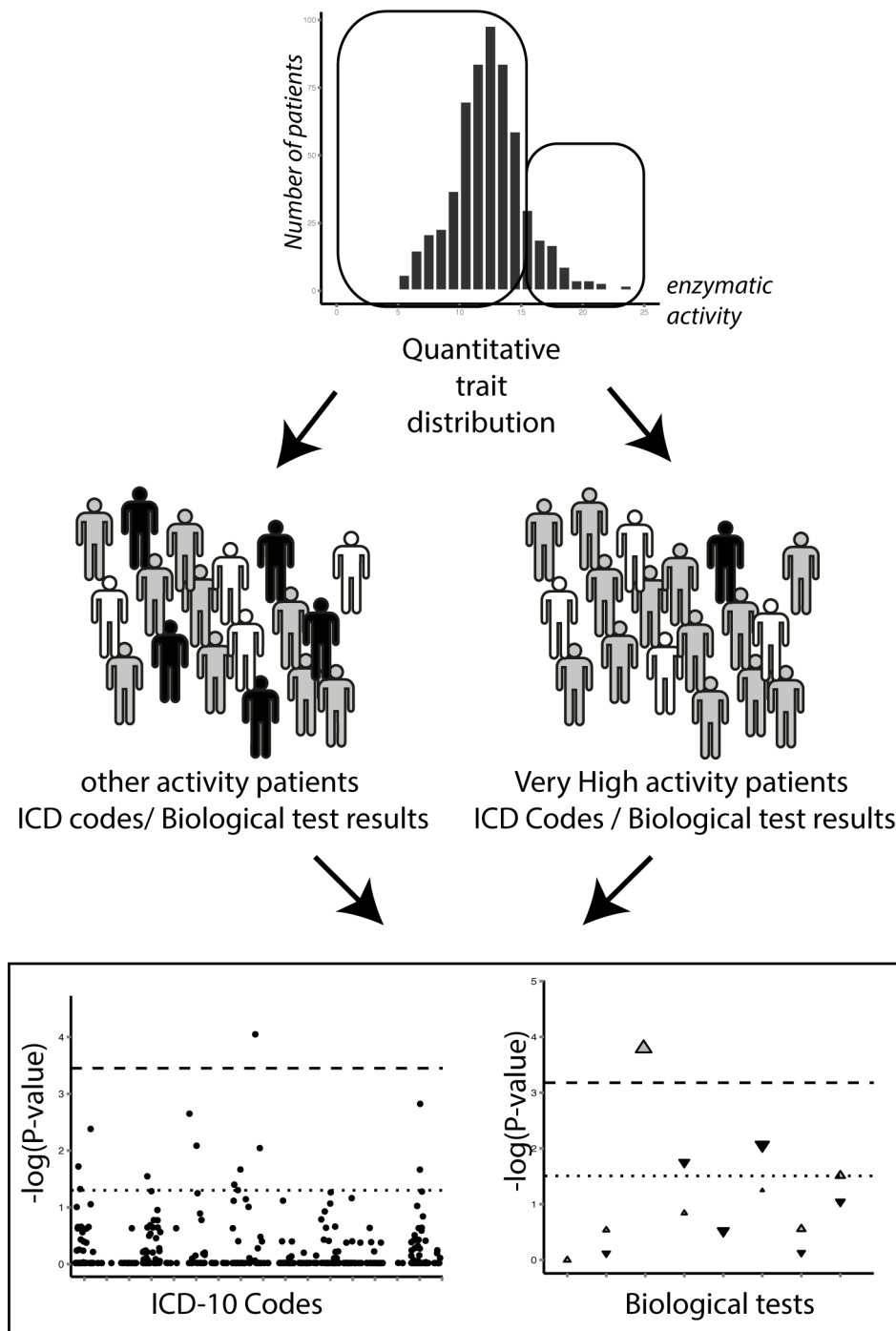
**Time restrictions.** The information concerning the treatment was found in the drug prescriptions, in free text reports or in clinical data from structured questionnaires. We extracted prescriptions from the CPOE drug prescriptions with starting dates or directly from free text reports using the brand name and the generic name (IMUREL, AZATHIOPRINE, IMURAN, MERCAPTOPURINE, PURINETHOL) and using the date of report as the starting date.

**ICD codes analysis.** We compared the proportions of cases and controls in the TPMTa groups: (i) vhTPMTa versus other TPMTa and the (ii) lowTPMTa versus other TPMTa. We selected the PheWAS codes with at least 5 occurrences for analysis.

**Biological test result analyses.** Among the biological tests, we focused on 11 routine blood tests widely prescribed during the monitoring of thiopurine treatment: leukocyte count (WBC), neutrophil count, RBC count, hemoglobin, platelet count, mean corpuscular volume (MCV), glycemia, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and gamma glutamyl-transpeptidase (GGT) (Table S1).

**Thiopurine efficacy analysis on free-text reports.** From study population, we selected the patients having at least two free-text reports with a reference to thiopurine therapy in their EHR. We excluded the patients with a reported adverse effect or intolerance to azathioprine or 6-mercaptopurine, and the patients whose treatment was interrupted within the first month.

Thiopurine failure was defined as at least one reference to inefficiency/failure of azathioprine/6-mercaptopurine therapy, or as a sustained dependency to steroids, reported by physicians in free-text reports. Of note, if the treatment was initially reported as effective, a secondary failure was not considered in our analysis.



**Figure 2. Schematic representation of a PheWAS on a quantitative trait, analyzing ICD codes and biological test results.** PheWAS: Phenome-wide association study; ICD: International classification of diseases; TPMT: thiopurine S-methyltransferase. Patients are assigned to a group depending on the level of a quantitative trait (e.g. TPMT activity). ICD codes and biological test results are screened to find systematic differences between the groups.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g002

Proportions of thiopurine therapy failure were compared between vhTPMTa patients and other TPMTa patients.

### Statistical analyses

Fisher exact test and unadjusted logistic regression were used to compare discrete variables. Continuous variables were compared

using Student t-test. Log-rank test was used to evaluate survival curves. We calculated the odds ratios (OR) and confidence intervals at 95% (95%CI). q-q plots were realized to evaluate the distribution of p-values. The p-value was fixed at 0.05. We used the False Discovery Rate (FDR) method to manage multiple testing and used the threshold of 0.2 [44].

**Table 1.** Description of electronic health records (EHRs) of the thiopurine S-methyltransferase activity tested patients (TPMT cohort) and the control patients.

		<i>TPMT cohort</i>				<b>Control Patients (%) n = 1668</b>
		<b>Low TPMTa (%) n = 52</b>	<b>Normal TPMTa (%) n = 413</b>	<b>Very high TPMTa (%) n = 89</b>	<b>All (%) n = 554</b>	
Year of birth	1900–1910	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1911–1920	0 (0)	4 (1)	1 (1.1)	5 (0.9)	12 (0.7)
	1921–1930	1 (1.9)	11 (2.7)	1 (1.1)	13 (2.3)	42 (2.5)
	1931–1940	4 (7.7)	33 (8)	6 (6.7)	43 (7.8)	120 (7.2)
	1941–1950	6 (11.5)	36 (8.7)	8 (9)	50 (9)	147 (8.8)
	1951–1960	6 (11.5)	51 (12.3)	14 (15.7)	71 (12.8)	216 (12.9)
	1961–1970	9 (17.3)	81 (19.6)	18 (20.2)	108 (19.5)	321 (19.2)
	1971–1980	11 (21.2)	90 (21.8)	20 (22.5)	121 (21.8)	372 (22.3)
	1981–1990	13 (25)	91 (22)	16 (18)	120 (21.7)	369 (22.1)
	1991–2000	2 (3.8)	16 (3.9)	5 (5.6)	23 (4.2)	69 (4.1)
	2001–2010	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sex	Male	33 (63.5)	202 (48.9)	40 (44.9)	275 (49.6)	843(50.5)
	Female	19 (36.5)	211 (51.1)	49 (55.1)	279 (50.4)	825(49.5)
Unit	Hepato-gastro enterology	-	-	-	2,667 (60.7)	393 (9.2)
	Digestive surgery	-	-	-	292 (6.6)	275 (6.4)
	Internal medicine	-	-	-	303 (6.9)	245 (5.7)
	Nephrology	-	-	-	272 (6.2)	237 (5.6)
	Pneumology	-	-	-	220 (5)	177 (4.1)
	ER	-	-	-	169 (3.8)	242 (5.7)
	Cardiovascular surgery	-	-	-	84 (1.9)	343 (8)
	Vascular medicine	-	-	-	82 (1.9)	320 (7.5)
	Cardiology	-	-	-	80 (1.8)	253 (5.9)
	Radiotherapy	-	-	-	36 (0.8)	133 (3.1)
	Immunology	-	-	-	33 (0.8)	153 (3.6)
	Anesthesia - Surgical intensive care	-	-	-	29 (0.7)	90 (2.1)
	Thoracic surgery	-	-	-	22 (0.5)	104 (2.4)
	Medical intensive care	-	-	-	23 (0.5)	36 (0.8)
	Otolaryngology	-	-	-	19 (0.4)	201 (4.7)
	Gynaecologic surgery	-	-	-	16 (0.4)	226 (5.3)
	Orthopedics	-	-	-	13 (0.3)	323 (7.6)
	Ambulatory surgery	-	-	-	13 (0.3)	147 (3.4)
	Preventive cardiovascular medicine	-	-	-	8 (0.2)	91 (2.1)
	Urology	-	-	-	7 (0.2)	49 (1.1)
	Cardiovascular radiology	-	-	-	4 (0.1)	12 (0.3)
	Plastic surgery	-	-	-	0 (0)	15 (0.4)
	Oncology	-	-	-	0 (0)	205 (4.8)
Encounter Type	Hospitalization	179 (46.3)	1,123 (38.4)	246 (42.8)	1,594 (39.7)	2,010 (34.2)
	Consultation	53 (13.7)	487 (16.7)	95 (16.5)	646 (16.1)	1,549 (26.4)
	Others	1 (0.3)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	135 (2.3)
	Post acute care	1 (0.3)	5 (0.2)	0 (0)	7 (0.2)	18 (0.3)
	Session	83 (21.4)	825 (28.2)	158 (27.5)	1,118 (27.9)	1,000 (17)
	Emergency Unit	70 (18.1)	484 (16.6)	76 (13.2)	644 (16.1)	1,163 (19.8)

Control patients are randomly extracted from the clinical data warehouse (CDW) of the Hôpital européen Georges Pompidou.

TPMTa: thiopurine S-methyltransferase activity; low TPMTa: <8.5 nmol/h/mL red blood cells; very high TPMTa: ≥15.0 nmol/h/mL red blood cells; normal TPMTa: in between.

doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.t001

## Ethics statement

This study was approved by the IRB and ethics committee CPP Ile-de-France II. IRB Committee # 00001072. Study reference # CDW\_2013\_0002.

## Results

### Participants

A total of 554 patients (*TPMT cohort*) underwent a TPMTa assessment. Of these patients, 460 had ICD-10 codes and at least one biological test result, and a total of 442 patients, *i.e. study population*, had also a notion of thiopurine treatment in their EHR. (Figure 3, Figure S6) These 442 EHRs included 10,252 ICD-10 occurrences and 72,711 results of the selected biological tests (Table 1). Of these patients, 324, representing 6,183 free-text reports, were included in the thiopurine efficacy validation analysis, after exclusion of the patients having less than two reports with a notion of thiopurine therapy and patients with an adverse effect or intolerance to thiopurines. (Figure 3) Known indications for thiopurine therapy, *e.g.*, Crohn's disease (OR, 699.6; 95%CI, 343.7–1,600,  $p = 1.73E-263$ ) or ulcerative colitis (OR, 583.1; 95%CI, 237.9–1,843,  $p = 1.5E-144$ ) and their consequences were significantly associated with the *TPMT cohort* versus hospital population (Table S3). No patient with leukemia or an associated pathology were found in the analysis, as there is no hematologic department at HEGP.

### PheWAS analysis

**ICD groupings.** Using our ICD-10 based aggregation, the 1,016 distinct ICD-10 codes occurring in the *study population* EHRs resulted in 156 distinct aggregated codes, including 83 codes with at least 5 occurrences. (Table S4) ICD-9-CM mapping aggregation led to 289 distinct aggregated codes, including 94 codes with at least 5 occurrences. (Table S5) These 156 and 289 aggregated codes represent respectively 59% and 37% of the aggregated classifications.

In the vhTPMTa versus other TPMTa analysis, two significant codes for ICD-10 based aggregation were found: diabetes mellitus ( $p = 0.0009$ ) and nutritional anemia ( $p = 0.0005$ ). These results agreed with the ICD-9-CM mapping codes ( $p = 0.0004$  and  $p = 0.0015$ , respectively). (Figures 4, 5, Tables S6, S7) These results remained significant after FDR multitesting evaluation for the two aggregation methods. (Tables S6, S7) The distribution of p-values did not show any systemic bias according to q-q plots. (Figure S3)

In the lowTPMTa versus other TPMTa analysis, no grouping showed statistically significant results after FDR correction. (Tables S8, S9, Figures S4, S5)

**Biological test results.** With the “global approach”, the proportion of patients with at least one episode of moderate to severe biological anemia was higher in the vhTPMTa group than in the other TPMTa group: 40.8% versus 26.1% (OR, 1.9; 95%CI, 1.2–3.3;  $p = 0.01$ ). (Table 2, Figure 6) Analyzing the same groupings, we also found that 13.6% of vhTPMTa patients had an episode of hyperglycemia versus 5.9% in the other TPMTa group (OR, 2.48; 95%CI, 1–6.1;  $p = 0.046$ ) (Table 3). The “frequency-based approach” confirmed that the mean frequency of moderate to severe biological anemia episodes was higher in the vhTPMTa group than in the other TPMTa group: 18% versus 9% of encounters ( $p = 0.01$ ). (Table 2) On the other hand, there was no statistically significant difference in the frequency of encounters with hyperglycemia between the two groups. (Table 3) With respect to neutropenia, it was interesting to note that there was no difference between the two groups using the global approach. However, the “frequency-based approach” identified a lower rate

of neutropenia in the vhTPMTa group than in the other TPMTa groups (Table 2).

There were no differences between groups when comparing lowTPMTa versus other TPMTa group using the “global approach”. However, the “frequency-based approach” showed a lower frequency of leucopenia (3.7% versus 10%,  $p = 0.02$ ) and neutropenia (0.9% versus 2.7%,  $p = 0.01$ ) in the lowTPMTa group compared to other TPMTa group. (Tables S10, S11)

### Event-free survival analysis

Event-free survival was evaluated for anemia and hyperglycemia. It showed that patients with vhTPMTa had a significant risk to have earlier anemia episodes than others ( $p = 0.04$ ). (Figure 7) Regarding the development of hyperglycemia, there was no difference between the groups.

### Thiopurine efficacy analysis

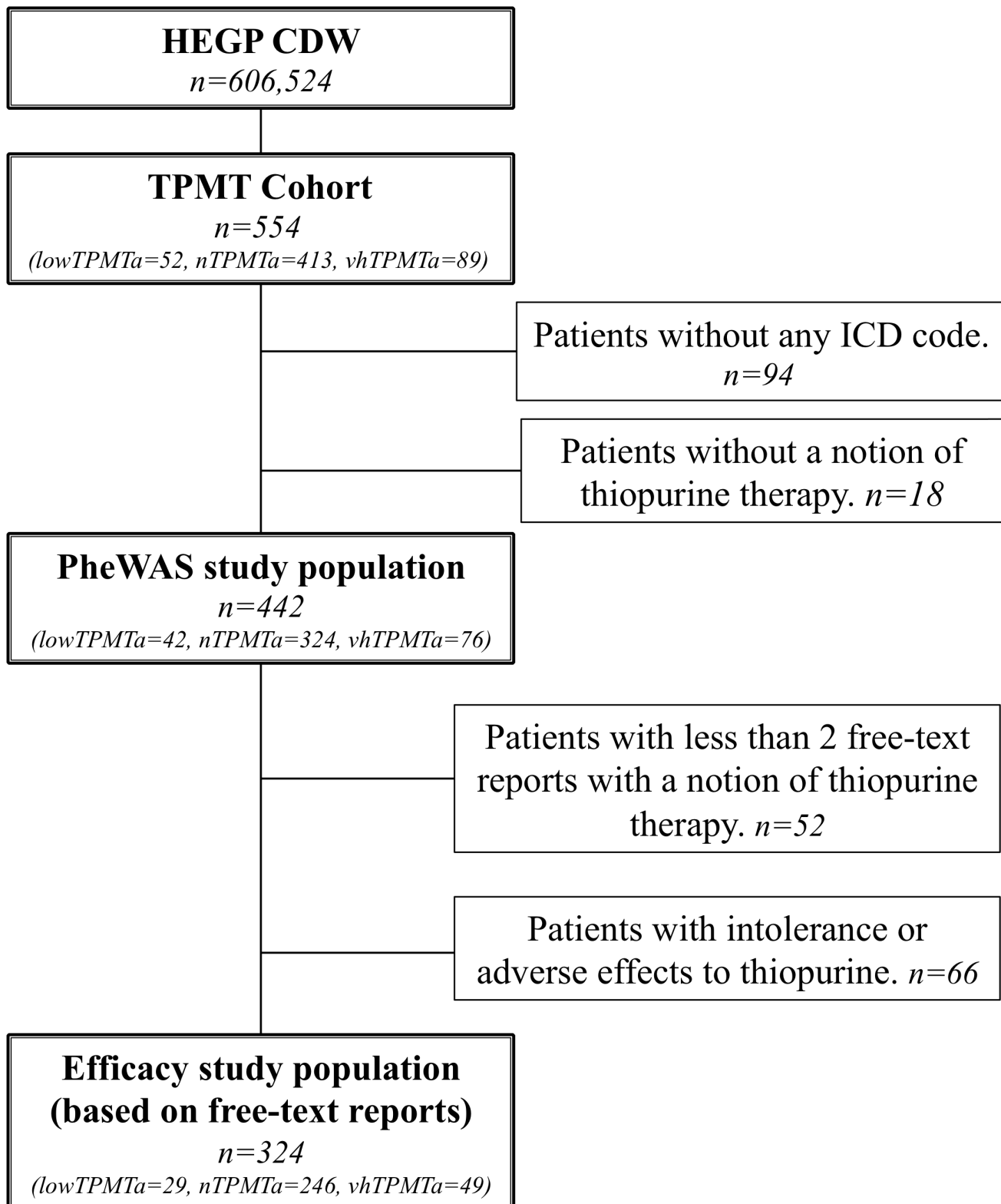
The efficacy analysis, based on free-text reports, showed 30.6% (15/49) of thiopurine therapy failure in the vhTPMTa group versus 13.1% (36/275) in the other TPMTa group (OR, 2.91; 95%CI, 1.33–6.17;  $p = 0.0045$ ). After adjustment for sex and age in a logistic regression model, we found an adjusted OR of 3.11 (95%CI, 1.61–6.04;  $p = 0.0007$ ).

## Discussion

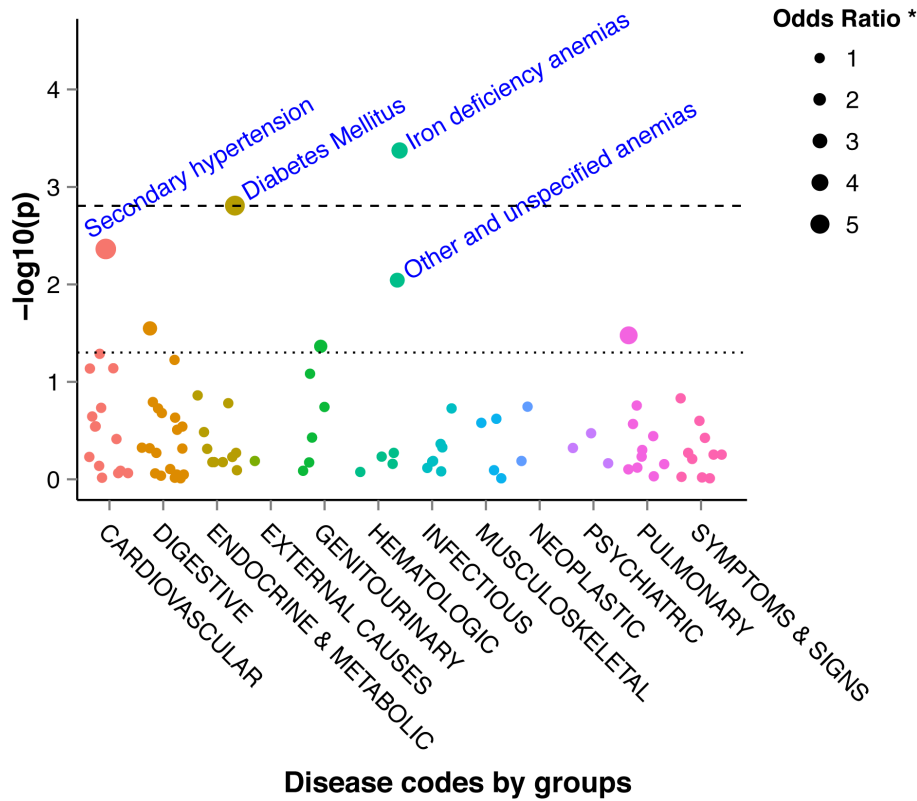
This study demonstrates the feasibility and benefits of performing a PheWAS on a quantitative trait. Two independent approaches, based on (i) ICD codes and (ii) biological test results, were used to discover pathophysiological features potentially associated with this quantitative trait. In this manner, findings can be cross-validated: the phenotypes extracted from diagnosis codes were confirmed by the biological test results. By this way and using a quantitative trait in the context of pharmacogenomics we discovered new potential associations between TPMTa related to thiopurine treatment and clinical data.

To our knowledge, this is the first PheWAS performed using data encoded with ICD-10 classification, as previously published PheWAS were based on ICD-9-CM. The consistency in the results found between the two aggregation methods –the ICD-10-based method and the mapping between ICD-9-CM and ICD-10– demonstrates the feasibility of PheWAS using ICD-10. In our study population and using the ICD code distribution described above, ICD-9-CM based PheWAS codes resulted in more informative phenotypes than the ICD-10 based. Thus, it appears that ICD code aggregation level, *i.e.* the number of code groups, needs to be optimized according to the size of the population. For example, in a larger population, it may be more appropriate to use a fine grained aggregation based on the 3 digit codes of ICD-10, resulting in more accurate phenotypes.

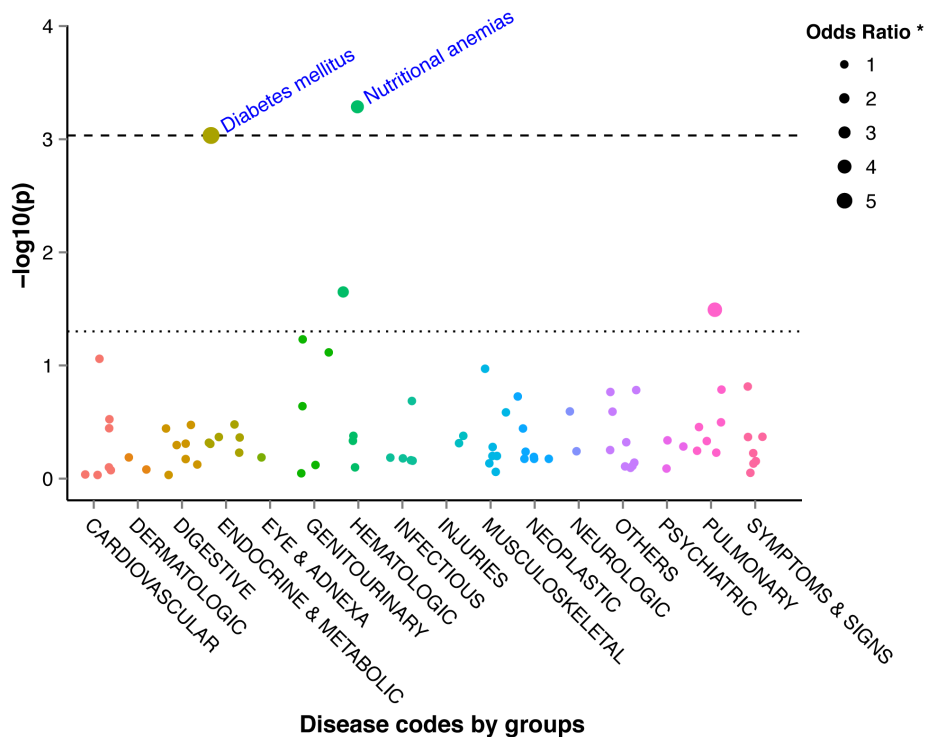
The use of a CDW gives the opportunity to combine data from six heterogeneous sources: demographic data from administrative records, diagnosis codes from the billing system, biological test results, drug prescriptions from the CPOE system, free text reports, and clinical data from structured questionnaires. The clinical interpretation of patient condition by the physician, encoded with ICD codes, and the biological test results, extracted from the laboratory result server, were confronted. Drug prescriptions were extracted directly from the structured data issued by CPOE, structured questionnaires and from free-text reports. The close relationship between thiopurine drug prescriptions and TPMTa assays for therapeutic management was taken into account by incorporating temporal data for this study.



**Figure 3. Flow chart.** HEGP CDW: Clinical data warehouse from Hôpital Européen Georges Pompidou, France. TPMT Cohort: patients with a thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity assessment in HEGP between January 2000 and July 2013. ICD: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. PheWAS: phenome-wide association study.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g003



**Figure 4. Manhattan plot of  $-\log_{10}$  (P-values) for the 771 ICD-9-CM based aggregated codes between very high TPMT activity patients and other TPMT activity patients.** ICD-9-CM: International classification of diseases 9 clinically modified; TPMT: thiopurine S-methyltransferase. The dotted line represents a P-value of 0.05 and the dashed line represents the FDR corrected level of significance for  $q=0.2$ . doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g004



**Figure 5. Manhattan plot of  $-\log_{10}$  (P-values) for the 256 ICD-10 based aggregated codes between very high TPMT activity patients and other TPMT activity patients.** ICD-10: International classification of diseases 10; TPMT: thiopurine S-methyltransferase. The dotted line represents a P-value of 0.05 and the dashed line represents the FDR corrected level of significance for  $q=0.2$ . doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g005



**Table 2.** Results of the low-value case biological test analyses between very high TPMT activity patients and other patients with normal and low TPMT activity.

Biological tests	Global approach		Frequency-based approach			
	vhTPMTa n = 76 (%)	nTPMTa + lowTPMTa n = 366 (%)	Odds Ratio [95%CI]	Unadjusted p-value	vhTPMTa encounter frequency	nTPMTa+lowTPMTa encounter frequency
Leukocyte count	20/76 (26.3)	84/360 (23.3)	1.2 [0.7–2.1]	0.58	0.13	0.09
Neutrophil count	1/76 (1.3)	16/357 (4.5)	0.3 [0–2.2]	0.22	0.003	0.014
Red blood cell count	68/76 (89.5)	304/360 (84.4)	1.6 [0.7–3.4]	0.26	0.78	0.71
Hemoglobin	31/76 (40.8)	94/360 (26.1)	1.9 [1.2–3.3]	0.01	0.18	0.09
Mean corpuscular volume	40/76 (52.6)	162/360 (45)	1.4 [0.8–2.2]	0.22	0.4	0.31
Platelet count	7/76 (9.2)	20/360 (5.6)	1.7 [0.7–4.2]	0.23	0.03	0.02
Glycemia	59/63 (93.7)	273/299 (91.3)	1.4 [0.5–4.2]	0.54	0.78	0.76
Alkaline phosphatase	25/71 (35.2)	117/336 (34.8)	1 [0.6–1.7]	0.95	0.19	0.18

Global approach: a low-value case is defined as at least one occurrence, over the study period, of biological test result below the low threshold defined in Table 1. Frequency-based approach: for a given patient, the frequency of low-value encounters is defined as the number of encounters with at least one occurrence below the low threshold divided by the number of encounters (mean low-value encounter frequencies are reported). Low-value case analyses have not been performed on alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma glutamyl-transpeptidase test results, as a low threshold is not relevant for these tests. TPMTa: thiopurine S-methyltransferase activity. lowTPMTa: low TPMTa (<8.5 nmol/h/mL red blood cells); vhTPMTa: very high TPMTa ( $\geq 15.0$  nmol/h/mL red blood cells); nTPMTa: normal TPMTa (in between). doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.t002

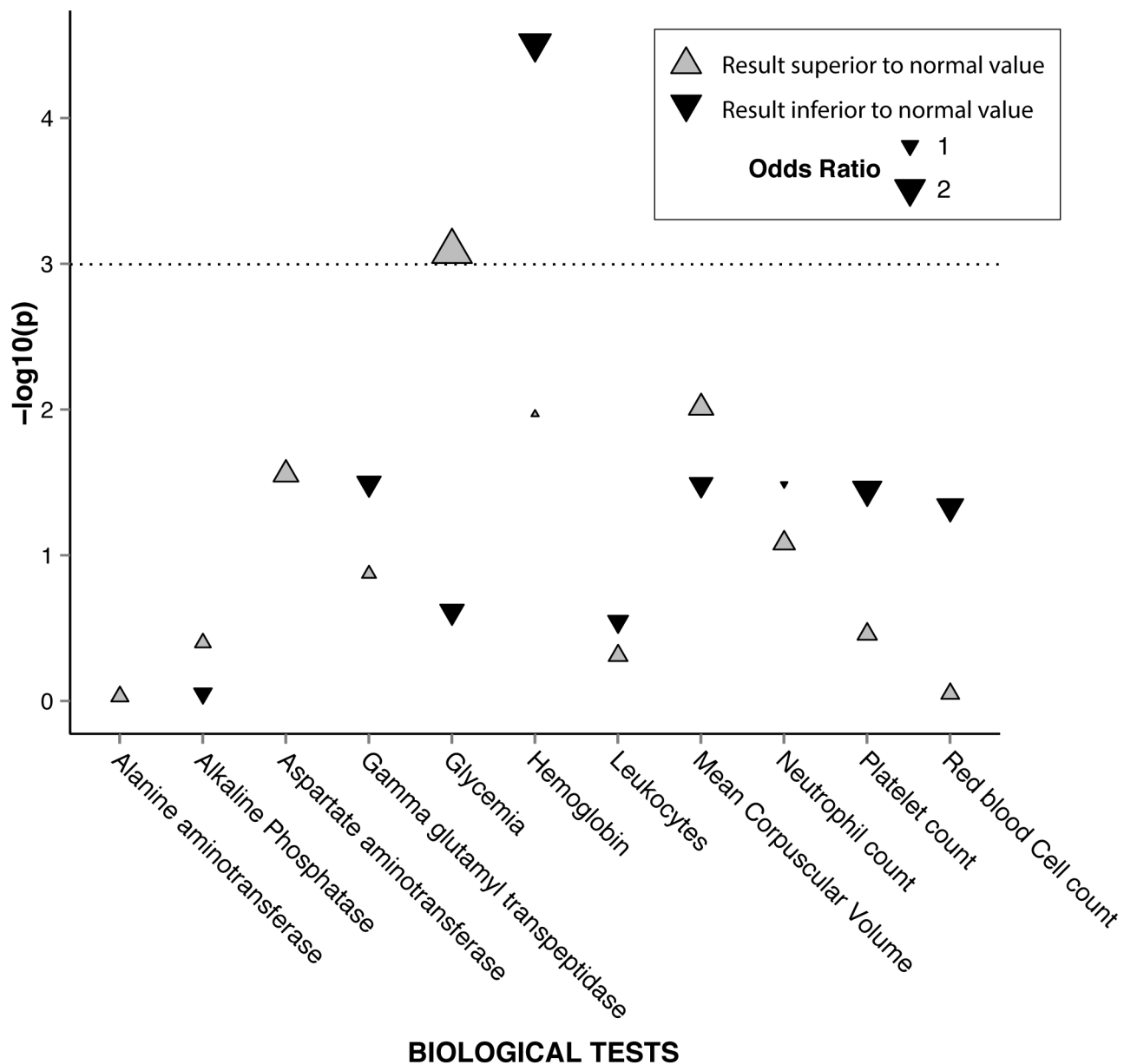
Therefore, we restricted our analyses to the events following the initiation of thiopurine therapy.

In addition to patient selection based on TPMTa, biological test results were employed to validate the phenotypes obtained from ICD codes analysis. Thus, we assessed the feasibility of expanding PheWAS to another type of data from the CDW. In that aim, classification algorithms were developed to transform continuous test results into discrete classes using value and frequency thresholds. Such algorithms could benefit from semantic web technologies [45], because description logic includes reasoning capabilities. First, the patient’s history was considered globally to compare the proportion of patients with an occurrence of abnormal biological test result between groups. In a second step, we analyzed the number of episodes for a specific biological abnormality, allowing us to compare event frequencies between TPMTa groups.

From a clinical point of view, the analyses using ICD-9-CM- or ICD-10-based groupings and biological test results are consistent, resulting in more frequent anemia in vhTPMTa patients than in other patients. In IBD, anemia is frequently observed and has a multifactorial etiology such as chronic inflammation or iron-deficiency caused by enteric bleeding [46]. In addition, myelo-suppressive drugs such as thiopurines can cause anemia [47]. In our study, the strong association between iron-deficiency anemia – observed by ICD codes and hemoglobin test results – and vhTPMTa could reflect more active disease in these patients. Moreover, evaluation of the anemia-free duration showed earlier episodes of anemia in the vhTPMTa group compared to other patients. Finally, thiopurine efficacy analysis on free-text reports showed a three times more therapy failure occurrences in the vhTPMTa group, in relation with anemia episodes and an active disease. Besides, an over-representation of diabetes mellitus, identified by ICD-9-CM and ICD-10 mapping analyses, has been observed in patients with a vhTPMTa. This result has been confirmed by glycemia test result analyses with more patients having hyperglycemia. Onset of type 2 diabetes or glucose intolerance could result from a sustained steroid therapy secondary to thiopurine resistance and active disease in vhTPMTa patients. This finding is strengthened by the weak association with secondary hypertension also known as a steroid adverse effect. Finally, the higher risk of thiopurine therapy failure in vhTPMTa patients, highlighted by free-text report analysis, is in agreement with sustained steroid therapy, according to IBD therapeutic management. Altogether, these findings suggested that patients with vhTPMTa could have more active disease than the others, leading to more frequent anemia episodes despite thiopurine therapy. These patients may benefit from more intensive thiopurine therapy to maintain remission, spare steroids and lessen common adverse effects.

As a limit of our PheWAS study, the study design does not distinguish the effect of vhTPMTa itself from a drug effect. A possible approach to assess this point would be to perform a PheWAS on patients with a TPMTa assessment but without thiopurine therapy. However, according to TPMTa testing indication, *i.e.* before starting a thiopurine therapy to screen TPMT-deficient patients, the HEGP CDW did not contain data to process such an analysis. Systematic TPMTa determination for inpatients, in a context a large DNA biobanking could be valuable for analyzing the impact of vhTPMTa on clinical phenotypes.

The number of patients in our study (n = 442) is relatively small. Previously published PheWAS were mainly based on pooled data or large population based cohorts [7,13,14]. However, despite the size of our study, we obtained statistically significant results and



**Figure 6. Pseudo-Manhattan plot of  $-\log_{10}(P\text{-values})$  for the 11 biological tests between very high TPMT activity patients and other TPMT activity patients.** Using the global approach, a high-value case, resp. low-value case, is defined as at least one occurrence of a biological test result above, resp. below, the high or low threshold. Low-value case analyses have not been performed on alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma glutamyl-transpeptidase test results, as a low threshold is not relevant for these tests. The dotted line represents a P-value of 0.05. Grey triangles represent the results above the high threshold and black triangles represent the results below the low threshold.

doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g006

supported by a clinical/biological cross-validation. This cross-validation was followed by a manual in-depth analysis of free-text reports to evaluate the validity of our initial conclusions. Regarding multiple testing issues, Denny *et al.* used a Bonferroni correction but estimated that it might be too restrictive [7,42,48]. We decided to use FDR because of its tolerance towards auto-correlated tests [49]. Given the cross-validation process based on the biological test results: (i) we did not exclude PheWAS codes with small numbers of cases from our analysis as in previous studies; (ii) and we considered the patients who had at least one occurrence of the ICD code *p* as having the phenotype *p*, whereas previous studies considered patients as cases when the ICD code

was present more than once in the patient record (a minimum of two or even four occurrences of the same code) [8,11,12,16].

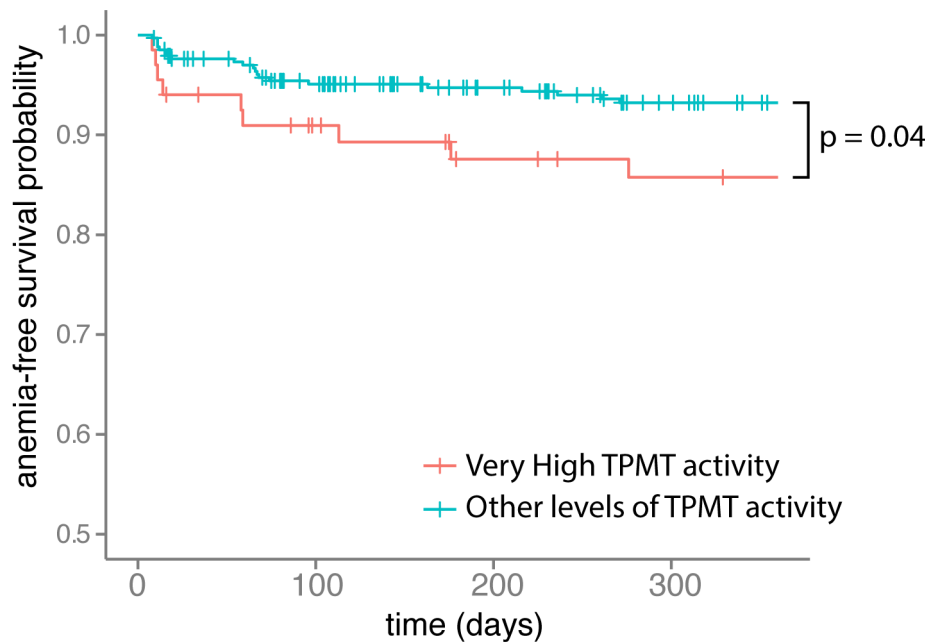
To be used as a selection criterion, a quantitative trait should be stable over the period of phenotype analysis. As all enzymes, TPMT can be influenced by physiological factors (*e.g.*, pregnancy) or co-treatments [29,50]. In our study, TPMTa was stable over the analysis period. To extend this method to other quantitative traits, this stability over time must be checked.

Regarding our ICD and biological test result analyses, it could be valuable to extend it to other retrospective cohorts or CDW. Finally, the implementation of a large prospective study, including patients treated by thiopurine according to their TPMTa, could

**Table 3.** Results of the high-value case biological test analyses between very high TPMT activity patients and other patients with normal and low TPMT activity.

Biological tests	Global approach		Frequency-based approach			
	vhTPMTa n = 76 (%)	nTPMTa+lowTPMTa n = 366 (%)	Odds Ratio [95%CI]	Unadjusted p-value	vhTPMTa encounter frequency	nTPMTa+lowTPMTa encounter frequency
Leukocyte count	52/76 (68.4)	239/360 (66.4)	1.1 [0.6–1.9]	0.733	0.41	0.37
Neutrophil count	41/76 (53.9)	171/357 (47.9)	1.27 [0.8–2.1]	0.339	0.24	0.2
Red blood cell count	5/76 (6.6)	23/360 (6.4)	1.03 [0.4–2.8]	0.951	0.01	0.02
<b>Hemoglobin</b>	2/76 (2.6)	27/360 (7.5)	0.33 [0.1–1.4]	0.14	<b>0.003</b>	<b>0.02</b>
Mean corpuscular volume	34/76 (44.7)	128/360 (35.6)	1.47 [0.9–2.4]	0.134	0.29	0.21
Platelet count	35/76 (46.1)	155/360 (43.1)	1.13 [0.7–1.9]	0.632	0.25	0.2
<b>Glycemia</b>	<b>8/59 (13.6)</b>	<b>17/286 (5.9)</b>	<b>2.48 [1–6.1]</b>	<b>0.046</b>	0.06	0.03
Alkaline phosphatase	31/71 (43.7)	156/336 (46.4)	0.89 [0.5–1.5]	0.671	0.31	0.28
Alanine aminotransferase	19/72 (26.4)	91/342 (26.6)	0.99 [0.6–1.8]	0.969	0.09	0.11
Aspartate aminotransferase	16/72 (22.2)	55/342 (16.1)	1.49 [0.8–2.8]	0.211	0.06	0.06
Gamma glutamyl-transpeptidase	15/72 (20.8)	85/335 (25.4)	0.77 [0.4–1.4]	0.418	0.11	0.13

Global approach: a low-value case is defined as at least one occurrence, over the study period, of biological test result below the low threshold defined in Table 1. Frequency-based approach: for a given patient, the frequency of low-value encounters is defined as the number of encounters with at least one occurrence below the low threshold divided by the number of encounters (mean low-value encounter frequencies are reported). TPMTa: thiopurine S-methyltransferase activity. lowTPMTa: low TPMTa (<8.5 nmol/h/mL red blood cells); vhTPMTa: very high TPMTa ( $\geq 15.0$  nmol/h/mL red blood cells); nTPMTa: normal TPMTa (in between). doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.t003



**Figure 7. Kaplan-Meier survival analysis of the time without anemia after starting thiopurine therapy in very high TPMT activity patients versus other TPMT activity patients.** TPMT: thiopurine *S*-methyltransferase. Analysis based on biological test results. Anemia was censored for hemoglobin test results below 9 g/100 mL. All events occurring within the first week after starting thiopurine therapy were excluded from the analysis. Follow-up was censored after 360 days. A log-rank test was used for this analysis.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1003405.g007

help to confirm our findings regarding vhTPMTa and thiopurine therapy failure associated with steroid side effects, and to develop further research.

We described here an original method to perform a PheWAS analysis on a quantitative trait, TPMTa, using both ICD-10 diagnosis codes and biological test results to identify associated phenotypes. This study highlighted a potential association between very high TPMT activity and signs that could be associated with a failure of thiopurine therapy and sustained steroid requirements in IBD patients. In the field of pharmacogenomics, PheWAS may allow the description of new subgroups of patients who need personalized clinical and therapeutic management.

## Supporting Information

**Figure S1 Comparison between Genome Wide Association Studies (GWAS) and Phenome Wide Association Studies (PheWAS).** SNP: single nucleotide polymorphism. A. GWAS: a group of patients with a selected phenotype (*i.e.* disease) is compared to a control group. All the genomic data available are screened to find systematic genomic differences between the groups. B. PheWAS: a group of patients with a selected allele or SNP on a particular gene is compared to a control group with different alleles on the same gene. All the phenotypic data available are screened to find systematic phenotypic differences between the groups.  
(EPS)

**Figure S2 Schematic representation of the discretization of quantitative biological test results for one single patient.** A. Global approach: a patient is considered as a high-value case if he has at least one occurrence of a biological test result above the high threshold. B. Frequency-based approach: the frequency of high-value encounters is defined as the number of

encounters with at least one occurrence above the high threshold divided by the number of encounters.  
(EPS)

**Figure S3 q-q plots of p-values from phenome-wide association study.** Left: q-q plot of p-values from the analysis of ICD codes with the ICD-10 based aggregation. Right: q-q plot of p-values from the analysis of ICD codes with the ICD-9-CM mapping based aggregation. The red line represents the normal distribution.  
(EPS)

**Figure S4 Manhattan plot of Phenome-wide association study (PheWAS) between low TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD-9-CM mapping aggregation.** Groups of ICD codes are represented by dots. Results of association tests (logistic regressions) are represented vertically ( $-\log_{10}(\text{p-value})$ ). The dotted line indicates  $p = 0.05$ . The dashed line indicates the FDR corrected level of significance for  $q = 0.2$ . When the p-value is under 0.05, the dot size represents the level of the odds-ratio. TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. Low TPMTa:  $<8.5$  nmol/h/mL red blood cells; Very high TPMTa:  $\geq 15.0$  nmol/h/mL red blood cells; Normal TPMTa: in between.  
(EPS)

**Figure S5 Manhattan plot of Phenome-wide association study (PheWAS) between low TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD-10 based aggregation.** Groups of ICD codes are represented by dots. Results of association tests (logistic regressions) are represented vertically ( $-\log_{10}(\text{p-value})$ ). The dotted line indicates  $p = 0.05$ . The dashed line indicates the FDR corrected level of significance for  $q = 0.2$ . When the p-value is under 0.05, the dot size represents the level of the odds-ratio.

TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. Low TPMTa: <8.5 nmol/h/mL red blood cells; Very high TPMTa: ≥15.0 nmol/h/mL red blood cells; Normal TPMTa: in between.  
(EPS)

**Figure S6 Distribution of TPMT activity in the study population (n = 442).** TPMT: thiopurine *S*-methyltransferase; RBC: red blood cells.  
(EPS)

**Table S1 Thresholds for biological test result analyses.** Thresholds have been defined according to the normal value ranges of the hospital laboratory. One test result occurrence below the low or above the high threshold defines a low-value case or a high-value case, respectively. \* one neutrophil count below the low threshold of 1.0 G/L defines a neutropenia [51]. \*\*one hemoglobin test result below the low threshold of 9.0 g/100 mL defines a moderate to severe biological anemia [52]. \*\*\* specially for glycemia, a high-value case (hyperglycemia) is defined by two test result occurrences above the high threshold [53].  
(DOCX)

**Table S2 Thiopurine S-methyltransferase activity (TPMTa) for patients with multiple assays.** RBC: red blood cells. TPMTa: TPMT activity. Over the 51 patients that underwent more than one TPMTa assay, only one patient had results that could induce a change in groups. He was assigned to the normal TPMTa group (group from his first TPMTa assessment). For all the other patients, we considered that the TPMTa was stable over time.  
(DOCX)

**Table S3 Results of the preliminary phenome-wide association study on patients from TPMT cohort versus randomly selected patients from hospital clinical data warehouse.** The ICD codes aggregation used was based on the 3-digit ICD-10 codes (2040 groups). Only the statistically significant results are reported here.  
(DOCX)

**Table S4 Distribution of PheWAS Codes from ICD-10 based aggregation.**  
(DOCX)

**Table S5 Distribution of PheWAS Codes from ICD-9-CM mapping aggregation.**  
(DOCX)

**Table S6 Results of the Phenome-wide association study (PheWAS) between very high TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD-9-CM mapping aggregation.** The ICD-9-CM mapping aggregation corresponds to 771 groups of codes. Associations are assessed using logistic regression. Only PheWAS codes with a p-value<0.05 are reported here. The q value for false discovery rate (FDR) was q=0.2. The p-value must be under the calculated FDR threshold to be considered as significant. TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. Low TPMTa: <8.5 nmol/h/mL red blood cells; Very high TPMTa: ≥15.0 nmol/h/mL red blood cells; Normal TPMTa: in between.  
(DOCX)

**Table S7 Results of the Phenome-wide association study (PheWAS) between very high TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD-10 based aggregation.** The ICD-10 based aggregation

corresponds to 256 groups of codes. Only PheWAS codes with a p-value<0.05 are reported here. Associations are assessed using logistic regression. The q value for false discovery rate (FDR) was q=0.2. The p-value must be under the calculated FDR threshold to be considered as significant. TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. Low TPMTa: <8.5 nmol/h/mL red blood cells; Very high TPMTa: ≥15.0 nmol/h/mL red blood cells; Normal TPMTa: in between.  
(DOCX)

**Table S8 Results of the Phenome-wide association study (PheWAS) between low TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD-9-CM mapping aggregation.** The ICD-9-CM mapping aggregation corresponds to 771 groups of codes. Only PheWAS codes with a p-value<0.05 are reported here. Associations are assessed using logistic regression. The q value for false discovery rate (FDR) was q=0.2. The p-value must be under the calculated FDR threshold to be considered as significant. TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. Low TPMTa: <8.5 nmol/h/mL red blood cells; Very high TPMTa: ≥15.0 nmol/h/mL red blood cells; Normal TPMTa: in between.  
(DOCX)

**Table S9 Results of the Phenome-wide association study (PheWAS) between low TPMT activity patients and other TPMT activity patients for the ICD10 based aggregation.** The ICD-10 based aggregation corresponds to 256 groups of codes. Only PheWAS codes with a p-value<0.05 are reported here. Associations are assessed using logistic regression. The q value for false discovery rate (FDR) was q=0.2. The p-value must be under the calculated FDR threshold to be considered as significant.  
(DOCX)

**Table S10 Results of the low-value case biological test analyses between low TPMT activity patients and other patients with normal and very high TPMT activity.** Global approach: a low-value case is defined as at least one occurrence, over the study period, of biological test result below the low threshold defined in Table 1. Frequency-based approach: for a given patient, the frequency of low-value encounters is defined as the number of encounters with at least one occurrence below the low threshold divided by the number of encounters (mean low-value encounter frequencies are reported). Low-value case analyses have not been performed on alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma glutamyl-transpeptidase test results, as a low threshold is not relevant for these tests.  
(DOCX)

**Table S11 Results of the high-value-case biological test analyses between low TPMT activity (lowTPMTa) patients and other patients.** Global approach: a high-value case is defined as at least one occurrence, over the study period, of biological test result above the high threshold defined in Table 1. Frequency-based approach: for a given patient, the frequency of low-value encounters is defined as the number of encounters with at least one occurrence below the low threshold divided by the number of encounters (mean low-value encounter frequencies are reported). TPMTa: thiopurine *S*-methyltransferase activity. low-TPMTa: low TPMTa (<8.5 nmol/h/mL red blood cells); vhTPMTa: very high TPMTa (≥15.0 nmol/h/mL red blood cells); nTPMTa: normal TPMTa (in between).  
(DOCX)

## Acknowledgments

Eric Zapletal: installation and management of the i2b2 HEGP CDW.

## References

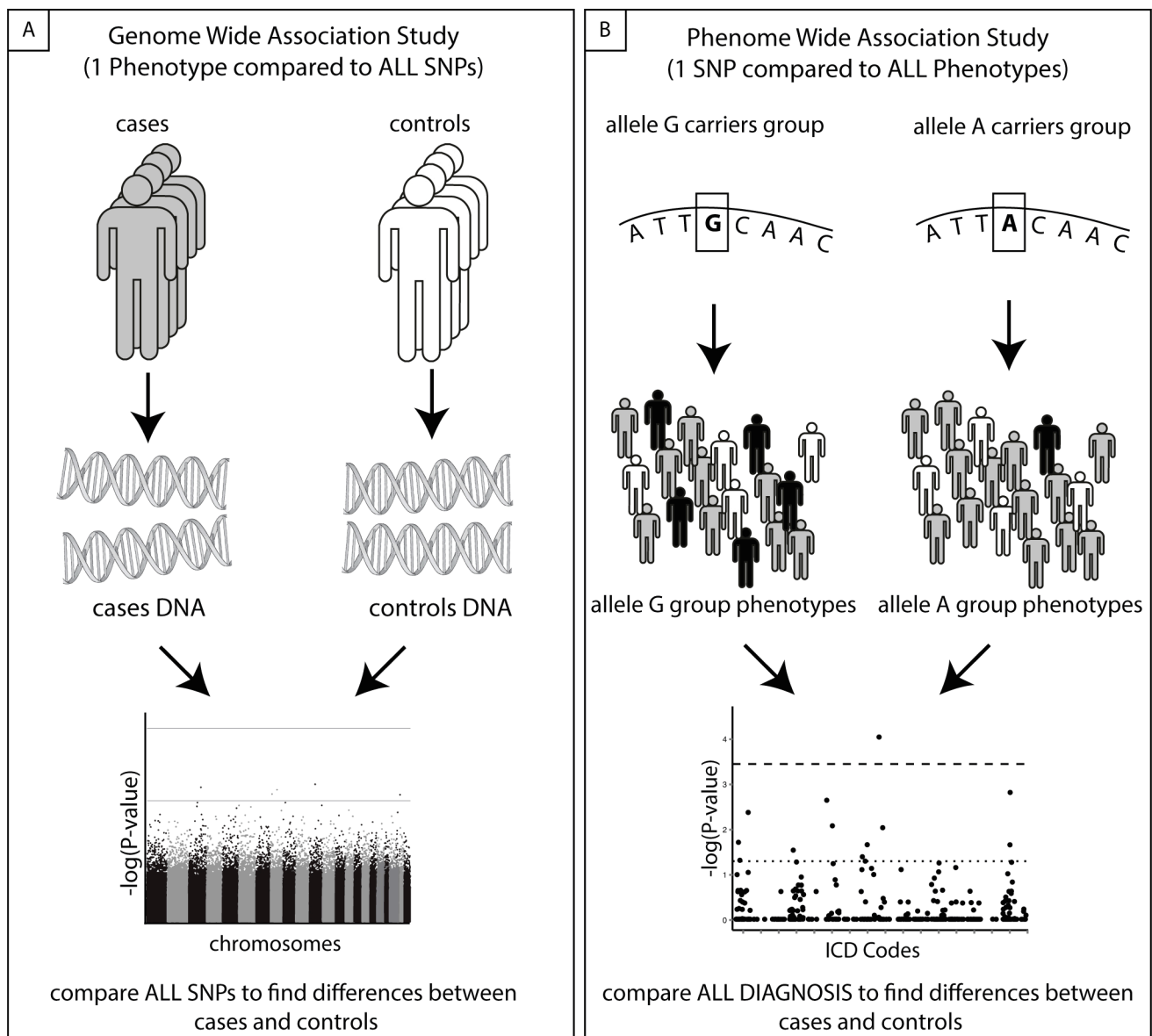
- (2011) Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease. Washington, D.C.: National Academies Press (US).
- Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS (2010) Genomic medicine—an updated primer. *N Engl J Med* 362: 2001–2011. doi:10.1056/NEJMr0907175.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, et al. (2005) Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308: 385–389. doi:10.1126/science.1109557.
- Hindorf LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, et al. (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 9362–9367. doi:10.1073/pnas.0903103106.
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851–861. doi:10.1038/nature06258.
- Hindorf LA, MacArthur J (European Bioinformatics Institute), Morales J (European Bioinformatics Institute), Junkins HA, Hall PN, et al. (n.d.) A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available: <http://www.genome.gov/gwastudies/>. Accessed 9 April 2013.
- Denny JC, Ritchie MD, Basford MA, Pulley JM, Bastarache L, et al. (2010) PheWAS: demonstrating the feasibility of a phenome-wide scan to discover gene-disease associations. *Bioinformatics* 26: 1205–1210. doi:10.1093/bioinformatics/btq126.
- Denny JC, Crawford DC, Ritchie MD, Bielinski SJ, Basford MA, et al. (2011) Variants near FOXE1 are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions: using electronic medical records for genome- and phenome-wide studies. *American journal of human genetics* 89: 529–542. doi:10.1016/j.ajhg.2011.09.008.
- WHO (2010) WHO | International Classification of Diseases (ICD). Available: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>. Accessed 5 January 2013.
- Roden DM, Pulley JM, Basford MA, Bernard GR, Clayton EW, et al. (2008) Development of a large-scale de-identified DNA biobank to enable personalized medicine. *ClinPharmacolTher* 84: 362–369. doi:10.1038/clpt.2008.89.
- Liao KP, Kurreeman F, Li G, Duclos G, Murphy S, et al. (2012) Autoantibodies, autoimmune risk alleles and clinical associations in rheumatoid arthritis cases and non-RA controls in the electronic medical records. *Arthritis Rheum*. doi:10.1002/art.37801.
- Hebbring SJ, Schrodi SJ, Ye Z, Zhou Z, Page D, et al. (2013) A PheWAS approach in studying HLA-DRB1\*1501. *Genes Immun*. doi:10.1038/gene.2013.2.
- Kho AN, Pacheco JA, Peissig PL, Rasmussen L, Newton KM, et al. (2011) Electronic medical records for genetic research: results of the eMERGE consortium. *SciTransl Med* 3: 79re1. doi:10.1126/scitranslmed.3001807.
- Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek SM, Torstenson ES, Ambite JL, et al. (2011) The use of phenome-wide association studies (PheWAS) for exploration of novel genotype-phenotype relationships and pleiotropy discovery. *Genetic epidemiology* 35: 410–422. doi:10.1002/gepi.20589.
- Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek S, Frase A, Torstenson ES, et al. (2013) Phenome-Wide Association Study (PheWAS) for Detection of Pleiotropy within the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Network. *PLoS Genet* 9: e1003087. doi:10.1371/journal.pgen.1003087.
- Ritchie MD, Denny JC, Zuvich RL, Crawford DC, Schilderout JS, et al. (2013) Genome- and Phenome-Wide Analysis of Cardiac Conduction Identifies Markers of Arrhythmia Risk. *Circulation*. Available: <http://circ.ahajournals.org/content/early/2013/03/05/CIRCULATIONAHA.112.000604>. Accessed 20 March 2013.
- Shah NH, Tenenbaum JD (2012) The coming age of data-driven medicine: translational bioinformatics' next frontier. *J Am Med Inform Assoc* 19: e2–4. doi:10.1136/amiajnl-2012-000969.
- Halevy A, Norvig P, Pereira F (2009) The Unreasonable Effectiveness of Data. *IEEE Intelligent Systems* 24: 8–12.
- Lowe HJ, Ferris TA, Hernandez PM, Weber SC (2009) STRIDE—An integrated standards-based translational research informatics platform. *AMIA AnnuSymp-Proc* 2009: 391–395.
- Murphy SN, Weber G, Mendis M, Gainer V, Chueh HC, et al. (2010) Serving the enterprise and beyond with informatics for integrating biology and the bedside (i2b2). *Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA* 17: 124–130. doi:10.1136/jamia.2009.000893.
- Szalma S, Koka V, Khasanova T, Perakslis ED (2010) Effective knowledge management in translational medicine. *J Transl Med* 8: 68. doi:10.1186/1479-5876-8-68.
- Kohane IS, Drazen JM, Campion EW (2012) A glimpse of the next 100 years in medicine. *N Engl J Med* 367: 2538–2539. doi:10.1056/NEJMe1213371.

## Author Contributions

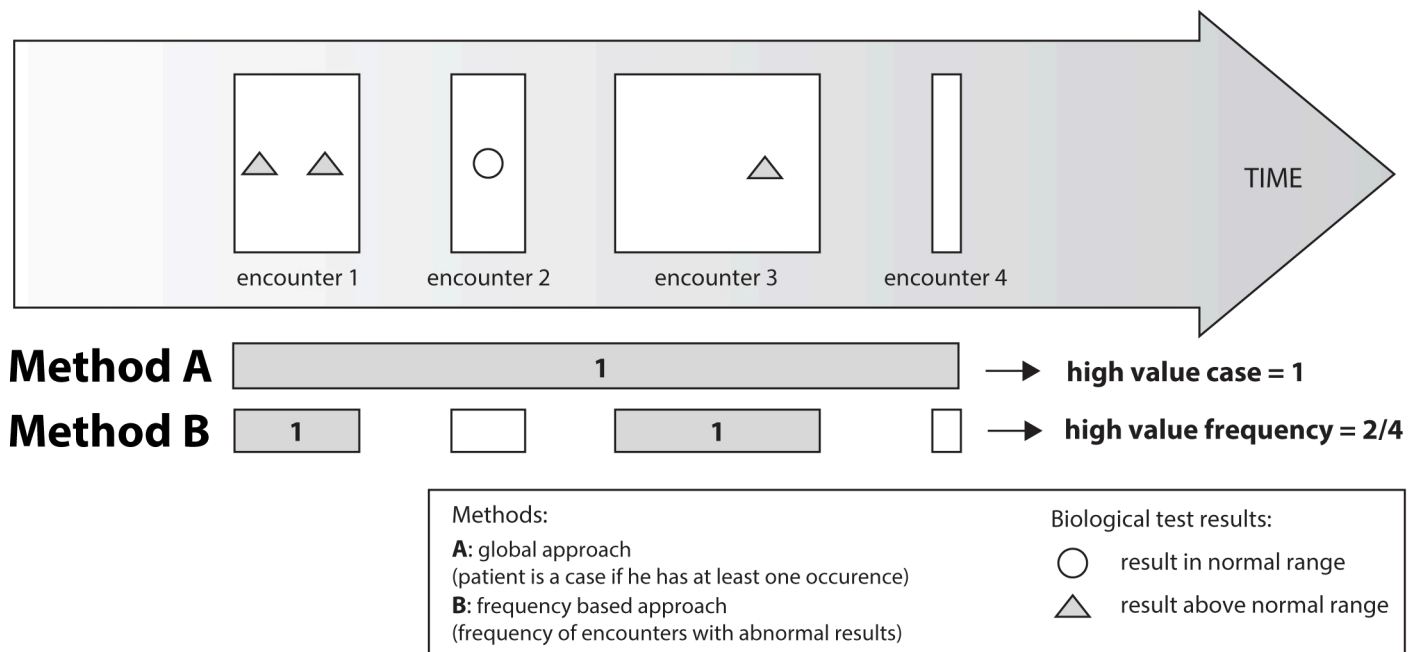
Conceived and designed the experiments: AN LC AB MAL PA. Performed the experiments: AN LC AB MAL PA. Analyzed the data: AN LC AB MAL PA. Contributed reagents/materials/analysis tools: GM CLB DR PB PD. Wrote the paper: AN LC AB MAL PA GM CLB DR PB PD. Obtained IRB approval: AN PA.

- Altman RB (2012) Translational Bioinformatics: Linking the Molecular World to the Clinical World. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 91: 994–1000. doi:10.1038/clpt.2012.49.
- Denny JC (2012) Chapter 13: Mining Electronic Health Records in the Genomics Era. *PLoSComputBiol* 8: e1002823. doi:10.1371/journal.pcbi.1002823.
- Roque FS, Jensen PB, Schmock H, Dalgaard M, Andreatta M, et al. (2011) Using Electronic Patient Records to Discover Disease Correlations and Stratify Patient Cohorts. *PLoSComputBiol* 7: e1002141. doi:10.1371/journal.pcbi.1002141.
- Bellazzi R, Masseroli M, Murphy S, Shabo A, Romano P (2012) Clinical Bioinformatics: challenges and opportunities. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 14: S1. doi:10.1186/1471-2105-13-S14-S1.
- Chouchana L, Narjoz C, Lorient M-A (2012) TPMT status determination: the simplest is the most effective? *J Crohns Colitis* 6: 807; author reply 808. doi:10.1016/j.crohns.2012.04.003.
- Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, et al. (2004) Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 14: 407–417.
- Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X (2012) Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 35: 15–36. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04905.x.
- Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, et al. (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89: 387–391. doi:10.1038/clpt.2010.320.
- Stocco G, Martellosi S, Barabino A, Fontana M, Lionetti P, et al. (2005) TPMT genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 37: 940–945. doi:10.1016/j.jld.2005.08.003.
- Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP (2002) The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 50: 485–489.
- Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, et al. (2002) 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 904–915.
- Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM (1987) Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *ClinPharmacolTher* 41: 18–25.
- Weinshilboum RM, Sladek SL (1980) Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32: 651–662.
- Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, et al. (2013) Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenomics* 23: 242–248. doi:10.1097/FPC.0b013e32835f1cc0.
- Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre E-M, et al. (2002) Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment PharmacolTher* 16: 1743–1750.
- Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, Lorient MA (2013) Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? *Clin Chem* 59: 1023–6.
- Zapletal E, Rodon N, Grabar N, Degoulet P (2010) Methodology of integration of a clinical data warehouse with a clinical information system: the HEGP case. *Studies in health technology and informatics* 160: 193–197.
- Mapping between ICD-10 and ICD-9 (2000). Ministry of Health of New Zealand. Available: <http://www.health.govt.nz/nz-health-statistics/data-references/mapping-tools/mapping-between-icd-10-and-icd-9>. Accessed 8 February 2013.
- Bodenreider O, Nelson SJ, Hole WT, Chang HF (1998) Beyond synonymy: exploiting the UMLS semantics in mapping vocabularies. *Proc AMIA Symp*: 815–819.
- Denny J (2013) ICD9 to PheWAS: Code translation map. Vanderbilt University. Available: [http://knowledgebase2.mc.vanderbilt.edu/research/sites/default/files/code\\_translation.txt](http://knowledgebase2.mc.vanderbilt.edu/research/sites/default/files/code_translation.txt). Accessed 8 January 2013.
- Anglicheau D, Sanquer S, Lorient MA, Beaune P, Therivet E (2002) Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci* 773: 119–127.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*: 289–300.
- Pathak J, Kiefer RC, Bielinski SJ, Chute CG (2012) Applying semantic web technologies for phenome-wide scan using an electronic health record linked Biobank. *J Biomed Semantics* 3: 10. doi:10.1186/2041-1480-3-10.

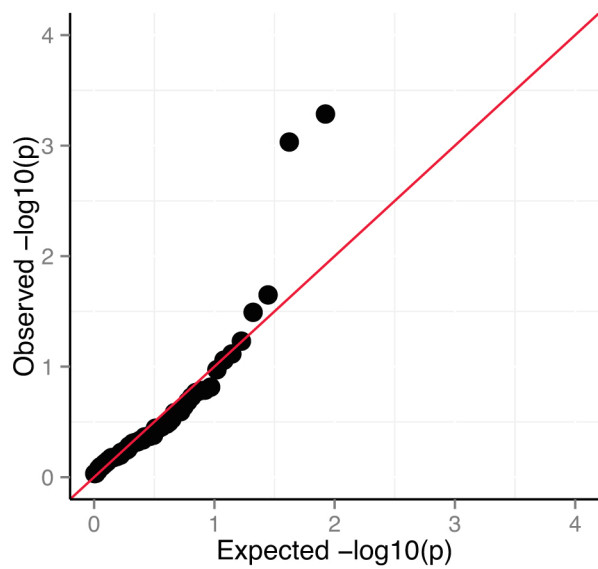
46. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, et al. (2010) Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 95: 199–205. doi:10.3324/haematol.2009.009985.
47. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM (1991) Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 119: 985–989.
48. Dunnett CW (1955) A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association* 50: 1096–1121. doi:10.1080/01621459.1955.10501294.
49. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 19: 368–375.
50. Jharap B, de Boer NKH, Stokkers P, Hommes DW, Oldenburg B, et al. (2013) Intra-uterine exposure and pharmacology of conventional thiopurine therapy in pregnant patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2012-303615.
51. Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF, Rodgers GP (2007) Prevalence of Neutropenia in the U.S. Population: Age, Sex, Smoking Status, and Ethnic Differences. *Ann Intern Med* 146: 486–492. doi:10.7326/0003-4819-146-7-200704030-00004.
52. WHO (2011) WHO|Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Available: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/en/index.html>. Accessed 29 January 2013.
53. WHO (2006) WHO|Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Available: [http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis\\_diabetes2006/en/index.html](http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/index.html). Accessed 28 January 2013.



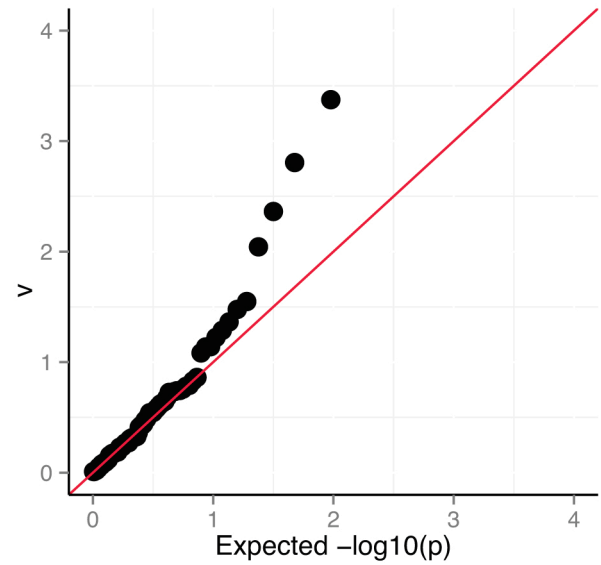


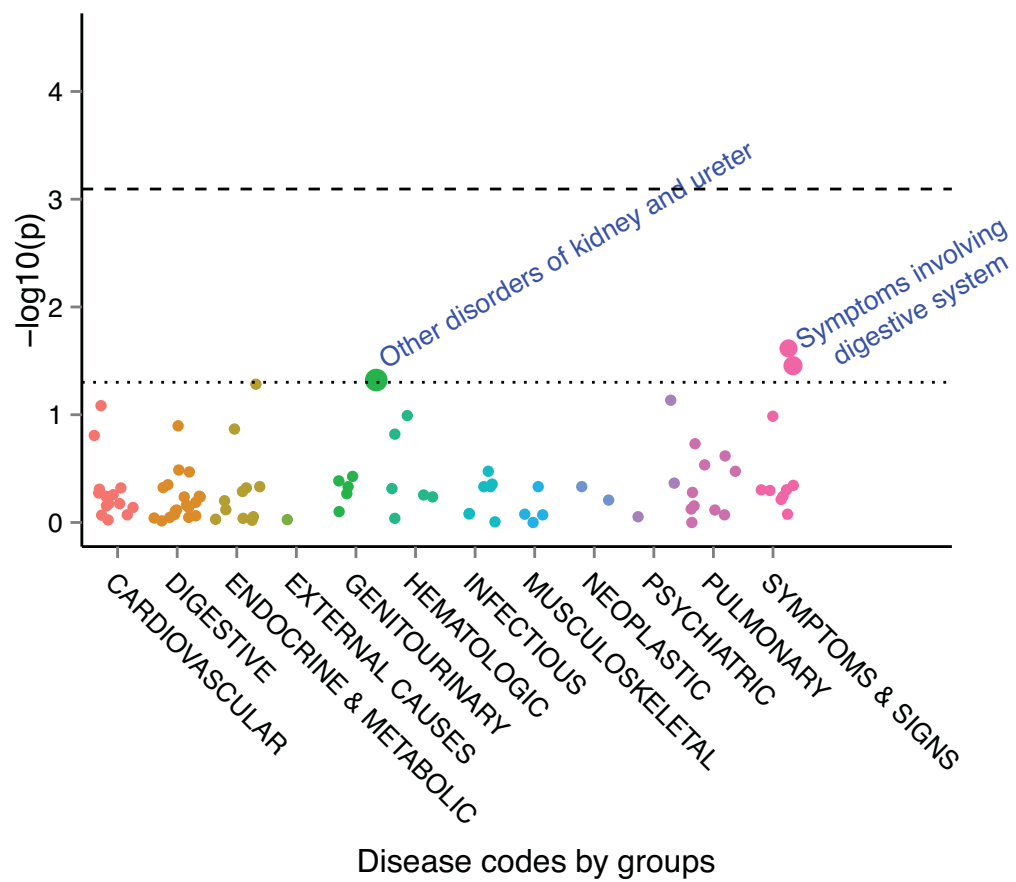


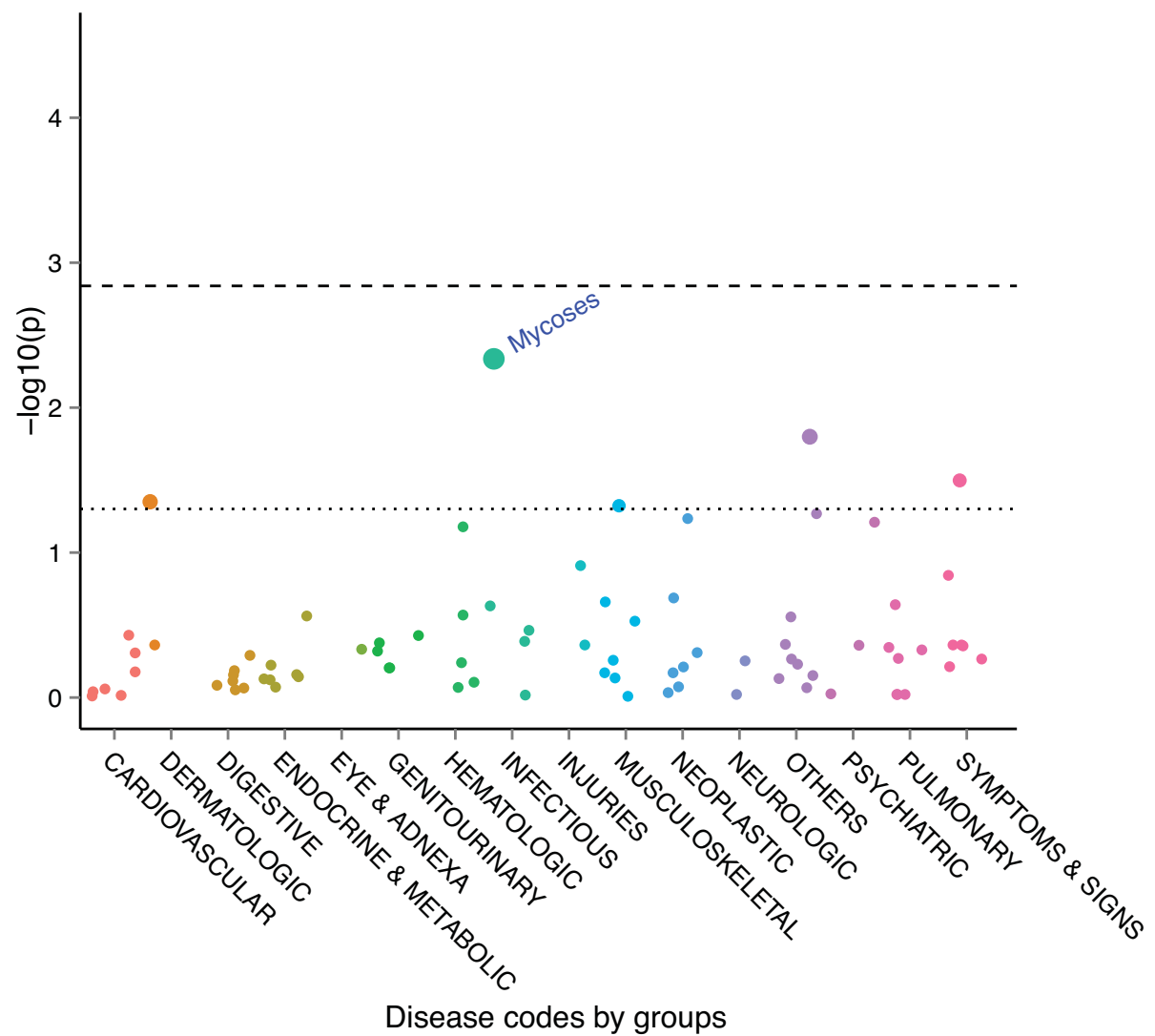
ICD 10 aggregation

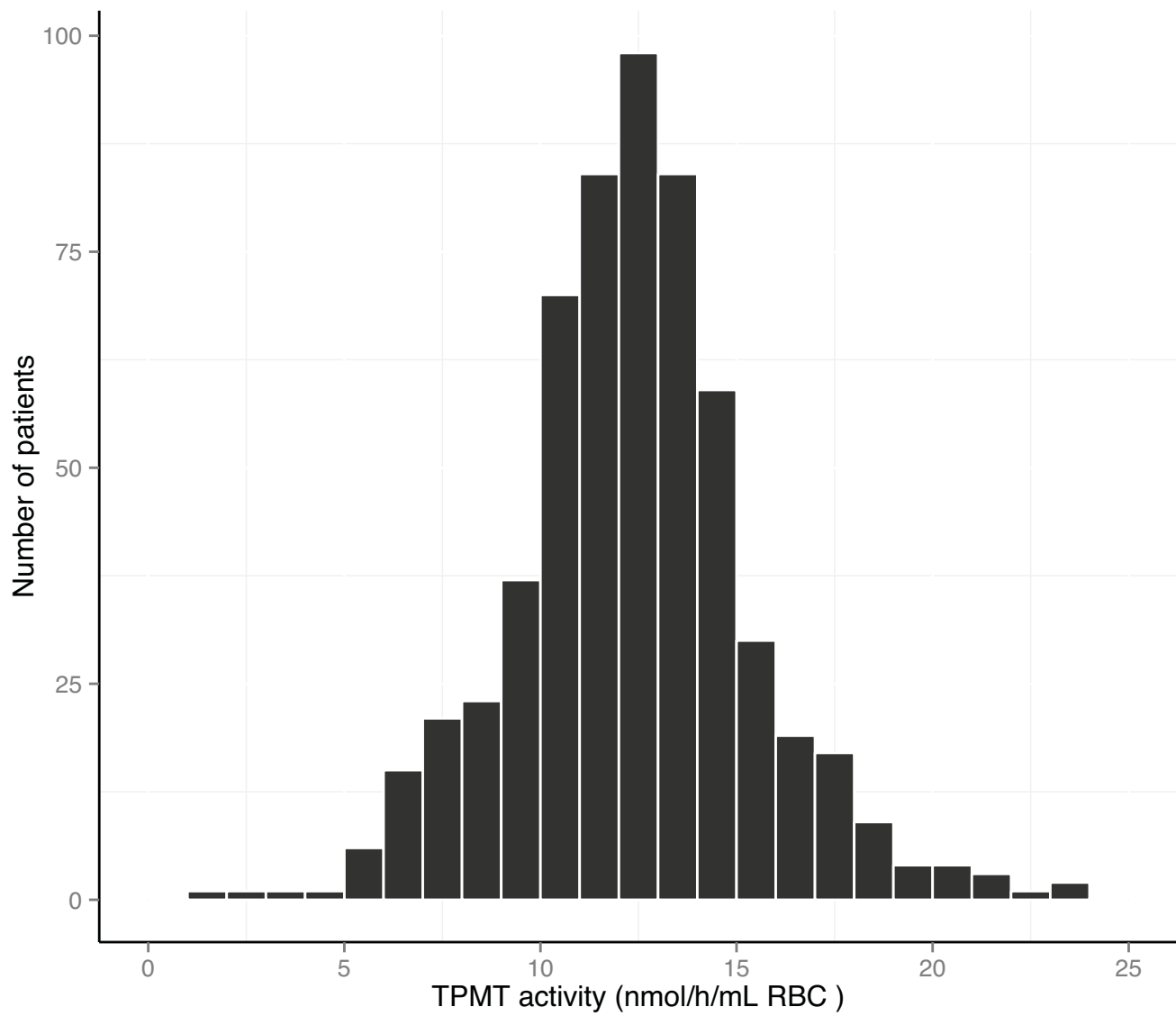


ICD9-CM mapping









**Table S1: Thresholds for biological test result analyses**

Biological tests	Units	Thresholds	
		Low	High
Leukocyte count	G/L	4.0	10.1
Neutrophil count *	G/L	1.0	10.0
Red blood cell count	T/L	4.4	5.5
Mean corpuscular volume	fL	84	96
Hemoglobin **	g/100 mL	9.0	16.1
Platelet count	G/L	100	450
Glycemia ***	mmol/L	3.3	11.1
Alkaline phosphatase	UI/L	42	80
Alanine aminotransferase	UI/L	-	70
Aspartate aminotransferase	UI/L	-	70
Gamma glutamyl-transpeptidase	UI/L	-	100

Thresholds have been defined according to the normal value ranges of the hospital laboratory. One test result occurrence below the low or above the **high threshold** defines a low-value case or a high-value case, respectively.

\* one neutrophil count below the low threshold of 1.0 G/L defines a neutropenia. [52]

\*\*one hemoglobin test result below the low threshold of 9.0 g/100 mL defines a moderate to severe biological anemia.[51]

\*\*\* specially for glycemia, a high-value case (hyperglycemia) is defined by two test result occurrences above the high threshold.[53]

Patient Number	First TPMTa assay (nmol/h/mL RBC)	Second TPMTa assay (nmol/h/mL RBC)
1	7.9	8.4
2	9.8	11.9
3	9.0	11.1
4	10.8	10.0
5	13.3	14.7
6	15.4	15.5
7	17.3	19.6
8	10.1	13.7
9	9.7	14.8
10	13.5	10.2
11	11.5	10.8
12	14.3	9.3
13	13.6	14.2
14	12.3	9.8
15	11.2	12.1
16	12.3	10.4
17	13.8	14.5
18	15.3	17.6
19	8.8	11.8
20	11.8	11.4
21	12.5	13.0
22	11.8	12.4
23	9.7	8.4
24	11.0	13.6
25	13.9	11.5
26	13.2	10.1
27	6.8	7.2
28	9.5	10.9
29	9.7	9.7
30	7.4	6.0
31	7.5	6.3
32	12.7	12.8
33	12.8	12.9
34	12.3	10.0
35	9.4	14.3
36	11.3	9.3
36	11.1	9.1
<b>37</b>	<b>10.2</b>	<b>15.9</b>
38	12.3	11.7
39	11.4	11.7
40	13.1	11.7
41	13.2	11.9
42	14.7	14.3
43	14.1	14.0

<b>Patient Number</b>	<b>First TPMTa assay (nmol/h/mL RBC)</b>	<b>Second TPMTa assay (nmol/h/mL RBC)</b>
44	12.7	11.9
45	12.4	14.5
46	6.9	7.2
47	12.8	14.5
48	15.9	15.7
49	8.6	9.3
50	13.3	14.2
51	11.5	10.7



Code	Name	Cases in TPMT cohort	Cases in hospital cohort	Odds-Ratio [95%CI]	p-value
K50	Crohn's disease [regional enteritis]	290/366 (79.2)	9/1652 (0.5)	699.6 [343.7 - 1600]	1.73E-263
K51	Ulcerative colitis	138/214 (64.5)	5/1648 (0.3)	583.1 [237.9 - 1843]	4.29E-145
K52	Other noninfective gastroenteritis and colitis	45/121 (37.2)	12/1655 (0.7)	80.2 [39.8 - 174.2]	1.87E-45
K56	Paralytic ileus and intestinal obstruction without hernia	56/351 (16)	15/1619 (0.9)	20.2 [11.1 - 39.1]	1.83E-30
K61	Abscess of anal and rectal regions	34/329 (10.3)	4/1608 (0.2)	46.1 [16.3 - 180.3]	5.84E-23
K63	Other diseases of intestine	37/332 (11.1)	8/1612 (0.5)	25.1 [11.3 - 63]	4.08E-22
K60	Fissure and fistula of anal and rectal regions	26/321 (8.1)	1/1605 (0.1)	140.9 [23 - 5595.4]	5.63E-20
D50	Iron deficiency anaemia	46/443 (10.4)	16/1668 (1)	11.9 [6.6 - 22.8]	9.02E-20
R10	Abdominal and pelvic pain	55/430 (12.8)	40/1647 (2.4)	5.9 [3.8 - 9.2]	4.00E-16
M31	Other necrotizing vasculopathies	27/426 (6.3)	4/1660 (0.2)	28 [9.7 - 110.7]	1.66E-15
K62	Other diseases of anus and rectum	27/322 (8.4)	11/1615 (0.7)	13.3 [6.3 - 30.1]	7.25E-14
E43	Unspecified severe protein-energy malnutrition	25/412 (6.1)	6/1650 (0.4)	17.7 [7 - 53]	3.96E-13
O04	Medical abortion	2/444 (0.5)	139/1666 (8.3)	0 [0 - 0.2]	1.09E-12
Y43	Adverse effects in the therapeutic use of primarily systemic agents	18/432 (4.2)	1/1659 (0.1)	71.9 [11.3 - 2956]	5.44E-12
K92	Other diseases of digestive system	26/418 (6.2)	14/1654 (0.8)	7.8 [3.9 - 16.2]	5.92E-10
N17	Acute renal failure	36/430 (8.4)	31/1637 (1.9)	4.7 [2.8 - 8]	1.51E-09
K65	Peritonitis	22/443 (5)	11/1667 (0.7)	7.9 [3.6 - 18.1]	1.47E-08
E44	Protein-energy malnutrition of moderate and mild degree	24/411 (5.8)	16/1660 (1)	6.4 [3.2 - 13]	2.04E-08
J84	Other interstitial pulmonary diseases	16/441 (3.6)	4/1658 (0.2)	15.5 [5 - 64.2]	2.39E-08
A04	Other bacterial intestinal infections	13/428 (3)	2/1661 (0.1)	25.9 [5.8 - 236.4]	6.74E-08
D64	Other anaemias	14/422 (3.3)	4/1648 (0.2)	14.1 [4.4 - 59.1]	2.43E-07
A09	Diarrhoea and gastroenteritis of presumed infectious origin	16/431 (3.7)	7/1666 (0.4)	9.1 [3.5 - 26.4]	4.64E-07
E46	Unspecified protein-energy malnutrition	13/400 (3.3)	4/1648 (0.2)	13.8 [4.2 - 58.4]	5.62E-07
A41	Other septicaemia	22/441 (5)	16/1660 (1)	5.4 [2.7 - 11.1]	5.76E-07
K85	Acute pancreatitis	15/428 (3.5)	6/1647 (0.4)	9.9 [3.6 - 31.4]	6.66E-07
M45	Ankylosing spondylitis	9/441 (2)	0/1667 (0)	-	7.19E-07
J99	Respiratory disorders in diseases classified elsewhere	8/421 (1.9)	0/1604 (0)	-	3.31E-06
K75	Other inflammatory liver diseases	11/426 (2.6)	3/1647 (0.2)	14.5 [3.8 - 81.3]	4.92E-06
K90	Intestinal malabsorption	14/406 (3.4)	8/1648 (0.5)	7.3 [2.8 - 20.3]	7.65E-06
I80	Phlebitis and thrombophlebitis	18/433 (4.2)	14/1644 (0.9)	5 [2.3 - 11.1]	1.02E-05
N18	Chronic renal failure	30/424 (7.1)	39/1645 (2.4)	3.1 [1.9 - 5.2]	1.12E-05
K83	Other diseases of biliary tract	8/421 (1.9)	1/1642 (0.1)	31.7 [4.2 - 1400.7]	2.11E-05
K59	Other functional intestinal disorders	10/305 (3.3)	6/1610 (0.4)	9 [3 - 30.5]	2.99E-05
I77	Other disorders of arteries and arterioles	14/427 (3.3)	9/1587 (0.6)	5.9 [2.4 - 15.7]	3.74E-05

M30	Polyarteritis nodosa and related conditions	6/405 (1.5)	0/1656 (0)	-	5.59E-05
N08	Glomerular disorders in diseases classified elsewhere	12/436 (2.8)	7/1660 (0.4)	6.7 [2.4 - 20.1]	6.86E-05
N01	Rapidly progressive nephritic syndrome	6/430 (1.4)	0/1653 (0)	-	7.53E-05
I27	Other pulmonary heart diseases	9/435 (2.1)	3/1648 (0.2)	11.6 [2.9 - 66.8]	8.44E-05
D69	Purpura and other haemorrhagic conditions	13/440 (3)	9/1663 (0.5)	5.6 [2.2 - 14.9]	9.64E-05
M80	Osteoporosis with pathological fracture	7/438 (1.6)	1/1649 (0.1)	26.7 [3.4 - 1199.2]	1.13E-04
R70	Elevated erythrocyte sedimentation rate and abnormality of plasma viscosity	7/436 (1.6)	1/1632 (0.1)	26.6 [3.4 - 1192.4]	1.17E-04
D12	Benign neoplasm of colon, rectum, anus and anal canal	20/436 (4.6)	22/1615 (1.4)	3.5 [1.8 - 6.8]	1.49E-04
R50	Fever of unknown origin	18/400 (4.5)	20/1556 (1.3)	3.6 [1.8 - 7.3]	1.56E-04
B96	Other bacterial agents as the cause of diseases classified to other chapters	13/437 (3)	10/1662 (0.6)	5.1 [2 - 13]	1.71E-04
S82	Fracture of lower leg, including ankle	0/444 (0)	39/1657 (2.4)	0 [0 - 0.4]	1.89E-04
M35	Other systemic involvement of connective tissue	8/407 (2)	3/1659 (0.2)	11 [2.6 - 65]	2.01E-04
R63	Symptoms and signs concerning food and fluid intake	10/392 (2.6)	6/1542 (0.4)	6.7 [2.2 - 22.5]	2.60E-04
K71	Toxic liver disease	8/423 (1.9)	3/1647 (0.2)	10.5 [2.5 - 62]	2.64E-04
D61	Other aplastic anaemias	7/415 (1.7)	2/1646 (0.1)	14.1 [2.7 - 139.7]	3.17E-04
R91	Abnormal findings on diagnostic imaging of lung	8/442 (1.8)	3/1663 (0.2)	10.2 [2.4 - 59.9]	3.23E-04
R11	Nausea and vomiting	10/385 (2.6)	7/1614 (0.4)	6.1 [2.1 - 19.1]	3.35E-04
D62	Acute posthaemorrhagic anaemia	13/421 (3.1)	12/1656 (0.7)	4.4 [1.8 - 10.5]	3.88E-04
K26	Duodenal ulcer	8/414 (1.9)	4/1613 (0.2)	7.9 [2.1 - 36.1]	6.48E-04
S61	Open wound of wrist and hand	0/441 (0)	32/1580 (2)	0 [0 - 0.4]	7.23E-04
E78	Disorders of lipoprotein metabolism and other lipidaemias	21/427 (4.9)	161/1625 (9.9)	0.5 [0.3 - 0.8]	7.86E-04
K91	Postprocedural disorders of digestive system, not elsewhere classified	8/400 (2)	5/1645 (0.3)	6.7 [1.9 - 26.1]	1.02E-03
D86	Sarcoidosis	7/439 (1.6)	3/1666 (0.2)	9 [2 - 54.1]	1.09E-03
K93	Disorders of other digestive organs in diseases classified elsewhere	5/397 (1.3)	1/1641 (0.1)	20.9 [2.3 - 984.5]	1.38E-03
M33	Dermatopolymyositis	4/403 (1)	0/1656 (0)	-	1.45E-03
D63	Anaemia in chronic diseases classified elsewhere	10/418 (2.4)	9/1653 (0.5)	4.5 [1.6 - 12.5]	1.61E-03
T45	Poisoning by primarily systemic and haematological agents, not elsewhere classified	6/443 (1.4)	2/1625 (0.1)	11.1 [2 - 113.1]	1.77E-03
M05	Seropositive rheumatoid arthritis	5/430 (1.2)	1/1655 (0.1)	19.4 [2.2 - 916.2]	1.82E-03
D84	Other immunodeficiencies	5/437 (1.1)	1/1664 (0.1)	19.2 [2.1 - 906.3]	1.90E-03
L40	Psoriasis	4/444 (0.9)	0/1668 (0)	-	1.93E-03
J96	Respiratory failure, not elsewhere classified	29/442 (6.6)	52/1656 (3.1)	2.2 [1.3 - 3.5]	1.95E-03
M60	Myositis	4/444 (0.9)	0/1653 (0)	-	1.99E-03
T81	Complications of procedures, not elsewhere classified	15/429 (3.5)	19/1628 (1.2)	3.1 [1.4 - 6.4]	2.08E-03
Y42	Adverse effects in the therapeutic use of hormones and their synthetic substitutes	6/420 (1.4)	3/1661 (0.2)	8 [1.7 - 49.7]	3.15E-03

	and antagonists, not elsewhere classified				
R74	Abnormal serum enzyme levels	6/435 (1.4)	3/1634 (0.2)	7.6 [1.6 - 47.1]	3.93E-03
K73	Chronic hepatitis, not elsewhere classified	5/420 (1.2)	2/1646 (0.1)	9.9 [1.6 - 104.2]	4.96E-03
B95	Streptococcus and staphylococcus as the cause of diseases classified to other chapters	8/432 (1.9)	7/1659 (0.4)	4.4 [1.4 - 14.5]	5.07E-03
S66	Injury of muscle and tendon at wrist and hand level	1/442 (0.2)	33/1581 (2.1)	0.1 [0 - 0.6]	5.13E-03
M06	Other rheumatoid arthritis	5/430 (1.2)	2/1656 (0.1)	9.7 [1.6 - 102.4]	5.29E-03
M25	Other joint disorders, not elsewhere classified	7/444 (1.6)	5/1645 (0.3)	5.2 [1.4 - 21.1]	5.46E-03
B37	Candidiasis	5/442 (1.1)	2/1666 (0.1)	9.5 [1.5 - 100.2]	5.72E-03
N41	Inflammatory diseases of prostate	5/443 (1.1)	2/1654 (0.1)	9.4 [1.5 - 99.2]	5.92E-03
E66	Obesity	17/444 (3.8)	122/1665 (7.3)	0.5 [0.3 - 0.9]	6.97E-03
N00	Acute nephritic syndrome	4/428 (0.9)	1/1654 (0.1)	15.6 [1.5 - 765]	7.39E-03
G62	Other polyneuropathies	4/441 (0.9)	1/1666 (0.1)	15.2 [1.5 - 747.8]	7.91E-03
B44	Aspergillosis	4/441 (0.9)	1/1665 (0.1)	15.2 [1.5 - 747.3]	7.93E-03
N02	Recurrent and persistent haematuria	3/427 (0.7)	0/1653 (0)	-	8.60E-03
M13	Other arthritis	3/428 (0.7)	0/1654 (0)	-	8.64E-03
F43	Reaction to severe stress, and adjustment disorders	3/434 (0.7)	0/1652 (0)	-	8.96E-03
B25	Cytomegaloviral disease	3/438 (0.7)	0/1665 (0)	-	8.99E-03
D72	Other disorders of white blood cells	3/437 (0.7)	0/1661 (0)	-	8.99E-03
M54	Dorsalgia	7/443 (1.6)	6/1664 (0.4)	4.4 [1.3 - 16.1]	9.11E-03
E86	Volume depletion	6/412 (1.5)	4/1468 (0.3)	5.4 [1.3 - 26.1]	1.00E-02
R57	Shock, not elsewhere classified	14/396 (3.5)	22/1558 (1.4)	2.6 [1.2 - 5.3]	1.02E-02

Code	Name	Number of patients (%) N = 442
K50-K52	Noninfective enteritis and colitis	303/442 (68.6)
Z40-Z54	Persons encountering health services for specific procedures and health care	199/442 (45)
K55-K63	Other diseases of intestines	111/442 (25.1)
Z80-Z99	Persons with potential health hazards related to family and personal history and certain conditions influencing health status	81/442 (18.3)
R50-R69	General symptoms and signs	56/442 (12.7)
Z00-Z13	Persons encountering health services for examination and investigation	54/442 (12.2)
I10-I15	Hypertensive diseases	52/442 (11.8)
R10-R19	Symptoms and signs involving the digestive system and abdomen	49/442 (11.1)
N17-N19	Renal failure	48/442 (10.9)
E40-E46	Malnutrition	48/442 (10.9)
K90-K93	Other diseases of the digestive system	47/442 (10.6)
D50-D53	Nutritional anaemias	41/442 (9.3)
M30-M36	Systemic connective tissue disorders	41/442 (9.3)
E70-E90	Metabolic disorders	35/442 (7.9)
D60-D64	Aplastic and other anaemias	34/442 (7.7)
J95-J99	Other diseases of the respiratory system	32/442 (7.2)
I70-I79	Diseases of arteries, arterioles and capillaries	30/442 (6.8)
T80-T88	Complications of surgical and medical care, not elsewhere classified	28/442 (6.3)
I30-I52	Other forms of heart disease	28/442 (6.3)
D10-D36	Benign neoplasms	27/442 (6.1)
K20-K31	Diseases of oesophagus, stomach and duodenum	26/442 (5.9)
Z70-Z76	Persons encountering health services in other circumstances	26/442 (5.9)
Y40-Y59	Drugs, medicaments and biological substances causing adverse effects in therapeutic use	25/442 (5.7)
K80-K87	Disorders of gallbladder, biliary tract and pancreas	25/442 (5.7)
R00-R09	Symptoms and signs involving the circulatory and respiratory systems	24/442 (5.4)
I80-I89	Diseases of veins, lymphatic vessels and lymph nodes, not elsewhere classified	24/442 (5.4)
C00-C97	Malignant neoplasms	23/442 (5.2)
A00-A09	Intestinal infectious diseases	23/442 (5.2)
J80-J84	Other respiratory diseases principally affecting the interstitium	21/442 (4.8)
J09-J18	Influenza and pneumonia	21/442 (4.8)
K65-K67	Diseases of peritoneum	21/442 (4.8)
I20-I25	Ischaemic heart diseases	20/442 (4.5)
J40-J47	Chronic lower respiratory diseases	20/442 (4.5)
A30-A49	Other bacterial diseases	20/442 (4.5)
N00-N08	Glomerular diseases	19/442 (4.3)
I26-I28	Pulmonary heart disease and diseases of pulmonary circulation	19/442 (4.3)
B95-B97	Bacterial, viral and other infectious agents	18/442 (4.1)
K70-K77	Diseases of liver	18/442 (4.1)
C00-C75	Malignant neoplasms, stated or presumed to be primary (of specified sites)	17/442 (3.8)
D65-D69	Coagulation defects, purpura and other haemorrhagic conditions	17/442 (3.8)
E10-E14	Diabetes mellitus	16/442 (3.6)
Z20-Z29	Persons with potential health hazards related to communicable diseases	16/442 (3.6)
M05-M14	Inflammatory polyarthropathies	16/442 (3.6)

F10-F19	Mental and behavioural disorders due to psychoactive substance use	16/442 (3.6)
E65-E68	Obesity and other hyperalimentation	15/442 (3.4)
R70-R79	Abnormal findings on examination of blood, without diagnosis	14/442 (3.2)
E00-E07	Disorders of thyroid gland	13/442 (2.9)
F30-F39	Mood [affective] disorders	12/442 (2.7)
F40-F48	Neurotic, stress-related and somatoform disorders	11/442 (2.5)
J90-J94	Other diseases of pleura	11/442 (2.5)
N10-N16	Renal tubulo-interstitial diseases	11/442 (2.5)
I60-I69	Cerebrovascular diseases	11/442 (2.5)
G40-G47	Episodic and paroxysmal disorders	10/442 (2.3)
D80-D89	Certain disorders involving the immune mechanism	10/442 (2.3)
M45-M49	Spondylopathies	10/442 (2.3)
J20-J22	Other acute lower respiratory infections	9/442 (2)
R90-R94	Abnormal findings on diagnostic imaging and in function studies, without diagnosis	9/442 (2)
E20-E35	Disorders of other endocrine glands	9/442 (2)
D70-D77	Other diseases of blood and blood-forming organs	9/442 (2)
M70-M79	Other soft tissue disorders	9/442 (2)
B25-B34	Other viral diseases	9/442 (2)
M80-M85	Disorders of bone density and structure	8/442 (1.8)
E50-E64	Other nutritional deficiencies	7/442 (1.6)
Z55-Z65	Persons with potential health hazards related to socioeconomic and psychosocial circumstances	7/442 (1.6)
T36-T50	Poisoning by drugs, medicaments and biological substances	7/442 (1.6)
N80-N98	Noninflammatory disorders of female genital tract	6/442 (1.4)
U80-U89	Bacterial agents resistant to antibiotics	6/442 (1.4)
G50-G59	Nerve, nerve root and plexus disorders	6/442 (1.4)
D37-D48	Neoplasms of uncertain or unknown behaviour	6/442 (1.4)
M20-M25	Other joint disorders	6/442 (1.4)
N40-N51	Diseases of male genital organs	6/442 (1.4)
R40-R46	Symptoms and signs involving cognition, perception, emotional state and behaviour	5/442 (1.1)
J60-J70	Lung diseases due to external agents	5/442 (1.1)
Y83-Y84	Surgical and other medical procedures as the cause of abnormal reaction of the patient, or of later complication, without mention of misadventure at the time of the procedure	5/442 (1.1)
H15-H22	Disorders of sclera, cornea, iris and ciliary body	5/442 (1.1)
L80-L99	Other disorders of the skin and subcutaneous tissue	5/442 (1.1)
B35-B49	Mycoses	5/442 (1.1)
C30-C39	Malignant neoplasms of respiratory and intrathoracic organs	5/442 (1.1)
C76-C80	Malignant neoplasms of ill-defined, secondary and unspecified sites	5/442 (1.1)
C81-C96	Malignant neoplasms of lymphoid, haematopoietic and related tissue	5/442 (1.1)
R25-R29	Symptoms and signs involving the nervous and musculoskeletal systems	5/442 (1.1)
M50-M54	Other dorsopathies	5/442 (1.1)
L00-L08	Infections of the skin and subcutaneous tissue	5/442 (1.1)
M60-M63	Disorders of muscles	4/442 (0.9)
C15-C26	Malignant neoplasms of digestive organs	4/442 (0.9)
G60-G64	Polyneuropathies and other disorders of the peripheral nervous system	4/442 (0.9)

K00-K14	Diseases of oral cavity, salivary glands and jaws	4/442 (0.9)
K40-K46	Hernia	4/442 (0.9)
T51-T65	Toxic effects of substances chiefly nonmedicinal as to source	4/442 (0.9)
L40-L45	Papulosquamous disorders	4/442 (0.9)
I95-I99	Other and unspecified disorders of the circulatory system	4/442 (0.9)
J30-J39	Other diseases of upper respiratory tract	4/442 (0.9)
N25-N29	Other disorders of kidney and ureter	4/442 (0.9)
N30-N39	Other diseases of urinary system	4/442 (0.9)
I05-I09	Chronic rheumatic heart diseases	3/442 (0.7)
R30-R39	Symptoms and signs involving the urinary system	3/442 (0.7)
C60-C63	Malignant neoplasms of male genital organs	3/442 (0.7)
S70-S79	Injuries to the hip and thigh	3/442 (0.7)
L60-L75	Disorders of skin appendages	3/442 (0.7)
A15-A19	Tuberculosis	3/442 (0.7)
A50-A64	Infections with a predominantly sexual mode of transmission	3/442 (0.7)
B00-B09	Viral infections characterized by skin and mucous membrane lesions	3/442 (0.7)
B15-B19	Viral hepatitis	3/442 (0.7)
H90-H95	Other disorders of ear	3/442 (0.7)
G30-G32	Other degenerative diseases of the nervous system	3/442 (0.7)
N20-N23	Urolithiasis	2/442 (0.5)
R20-R23	Symptoms and signs involving the skin and subcutaneous tissue	2/442 (0.5)
H80-H83	Diseases of inner ear	2/442 (0.5)
L20-L30	Dermatitis and eczema	2/442 (0.5)
S30-S39	Injuries to the abdomen, lower back, lumbar spine and pelvis	2/442 (0.5)
M91-M94	Chondropathies	2/442 (0.5)
N70-N77	Inflammatory diseases of female pelvic organs	2/442 (0.5)
R80-R82	Abnormal findings on examination of urine, without diagnosis	2/442 (0.5)
X60-X84	Intentional self-harm	2/442 (0.5)
Y90-Y98	Supplementary factors related to causes of morbidity and mortality classified elsewhere	2/442 (0.5)
C51-C58	Malignant neoplasms of female genital organs	2/442 (0.5)
G00-G09	Inflammatory diseases of the central nervous system	2/442 (0.5)
B20-B24	Human immunodeficiency virus [HIV] disease	2/442 (0.5)
O00-O08	Pregnancy with abortive outcome	2/442 (0.5)
Q20-Q28	Congenital malformations of the circulatory system	2/442 (0.5)
L50-L54	Urticaria and erythema	2/442 (0.5)
F00-F09	Organic, including symptomatic, mental disorders	2/442 (0.5)
K35-K38	Diseases of appendix	2/442 (0.5)
M00-M03	Infectious arthropathies	1/442 (0.2)
M95-M99	Other disorders of the musculoskeletal system and connective tissue	1/442 (0.2)
G10-G13	Systemic atrophies primarily affecting the central nervous system	1/442 (0.2)
G80-G83	Cerebral palsy and other paralytic syndromes	1/442 (0.2)
B50-B64	Protozoal diseases	1/442 (0.2)
S40-S49	Injuries to the shoulder and upper arm	1/442 (0.2)
M15-M19	Arthrosis	1/442 (0.2)
M86-M90	Other osteopathies	1/442 (0.2)
R47-R49	Symptoms and signs involving speech and voice	1/442 (0.2)

J00-J06	Acute upper respiratory infections	1/442 (0.2)
J85-J86	Suppurative and necrotic conditions of lower respiratory tract	1/442 (0.2)
Y10-Y34	Event of undetermined intent	1/442 (0.2)
C45-C49	Malignant neoplasms of mesothelial and soft tissue	1/442 (0.2)
C64-C68	Malignant neoplasms of urinary tract	1/442 (0.2)
I00-I02	Acute rheumatic fever	1/442 (0.2)
G20-G26	Extrapyramidal and movement disorders	1/442 (0.2)
G70-G73	Diseases of myoneural junction and muscle	1/442 (0.2)
G90-G99	Other disorders of the nervous system	1/442 (0.2)
H60-H62	Diseases of external ear	1/442 (0.2)
H65-H75	Diseases of middle ear and mastoid	1/442 (0.2)
A65-A69	Other spirochaetal diseases	1/442 (0.2)
A80-A89	Viral infections of the central nervous system	1/442 (0.2)
O10-O16	Oedema, proteinuria and hypertensive disorders in pregnancy, childbirth and the puerperium	1/442 (0.2)
Q30-Q34	Congenital malformations of the respiratory system	1/442 (0.2)
H25-H28	Disorders of lens	1/442 (0.2)
H46-H48	Disorders of optic nerve and visual pathways	1/442 (0.2)
H49-H52	Disorders of ocular muscles, binocular movement, accommodation and refraction	1/442 (0.2)
H53-H54	Visual disturbances and blindness	1/442 (0.2)
H55-H59	Other disorders of eye and adnexa	1/442 (0.2)
F20-F29	Schizophrenia, schizotypal and delusional disorders	1/442 (0.2)
F50-F59	Behavioural syndromes associated with physiological disturbances and physical factors	1/442 (0.2)
F90-F98	Behavioural and emotional disorders with onset usually occurring in childhood and adolescence	1/442 (0.2)
S00-S09	Injuries to the head	1/442 (0.2)
S60-S69	Injuries to the wrist and hand	1/442 (0.2)
T66-T78	Other and unspecified effects of external causes	1/442 (0.2)
Z30-Z39	Persons encountering health services in circumstances related to reproduction	1/442 (0.2)

Code	Name	Number of patients (%) N = 442
555	Regional enteritis	239/442 (54.1)
556	Ulcerative colitis	105/442 (23.8)
401	hypertension	46/442 (10.4)
560	Intestinal obstruction without mention of hernia	45/442 (10.2)
569	Other disorders of intestine	43/442 (9.7)
280	Iron deficiency anemias	41/442 (9.3)
789	Other symptoms involving abdomen and pelvis	41/442 (9.3)
584	Acute renal failure	35/442 (7.9)
780	Altered mental status	32/442 (7.2)
285	Other and unspecified anemias	31/442 (7)
263	Other and unspecified protein-calorie malnutrition	31/442 (7)
585	Chronic kidney disease (CKD)	29/442 (6.6)
446	Polyarteritis nodosa and allied conditions	28/442 (6.3)
558	Other and unspecified noninfectious gastroenteritis and colitis	28/442 (6.3)
518	Other diseases of lung	27/442 (6.1)
578	Gastrointestinal hemorrhage	25/442 (5.7)
260	severe protein-calorie malnutrition	22/442 (5)
272	Disorders of lipid metabolism	21/442 (4.8)
566	Abscess of anal and rectal regions	21/442 (4.8)
786	Symptoms involving respiratory system and other chest symptoms	21/442 (4.8)
785	Symptoms involving cardiovascular system	20/442 (4.5)
567	Peritonitis and retroperitoneal infections	20/442 (4.5)
411	ISCHEMIC HEART DISEASE	19/442 (4.3)
516	Other alveolar and parietoalveolar pneumonopathy	18/442 (4.1)
41	Bacterial infection in conditions classified elsewhere and of unspecified site	18/442 (4.1)
38	Septicemia	18/442 (4.1)
427	Paroxysmal tachycardia, unspecified	17/442 (3.8)
250	Diabetes Mellitus	16/442 (3.6)
440	Atherosclerosis	15/442 (3.4)
428	Heart failure	15/442 (3.4)
583	Nephritis and nephropathy, not specified as acute or chronic	14/442 (3.2)
451	Phlebitis and thrombophlebitis	14/442 (3.2)
453	Pulmonary embolus and DVT	14/442 (3.2)
579	Intestinal malabsorption	14/442 (3.2)
790	Nonspecific findings on examination of blood	13/442 (2.9)
447	Other disorders of arteries and arterioles	13/442 (2.9)
287	Purpura and other hemorrhagic conditions	13/442 (2.9)
787	Symptoms involving digestive system	13/442 (2.9)
405	Secondary hypertension	12/442 (2.7)
296	Bipolar	12/442 (2.7)
565	Anal fissure and fistula	11/442 (2.5)
530	Diseases of esophagus	11/442 (2.5)
276	Disorders of fluid, electrolyte, and acid-base balance	11/442 (2.5)



305	Nondependent abuse of drugs	11/442 (2.5)
564	Functional digestive disorders, not elsewhere classified	11/442 (2.5)
415	pulmonary heart disease	10/442 (2.3)
710	Diffuse diseases of connective tissue	10/442 (2.3)
482	Other bacterial pneumonia	10/442 (2.3)
517	Lung involvement in conditions classified elsewhere	10/442 (2.3)
8	Intestinal infections due to other organisms	10/442 (2.3)
466	Acute bronchitis and bronchiolitis	9/442 (2)
211	Benign neoplasm of other parts of digestive system	9/442 (2)
793	Nonspecific abnormal findings on radiological and other examination of body structure	9/442 (2)
573	Other disorders of liver	9/442 (2)
300	Anxiety, dissociative and somatoform disorders	9/442 (2)
9	Ill-defined intestinal infections	8/442 (1.8)
531	Peptic ulcers	8/442 (1.8)
496	Chronic airway obstruction, not elsewhere classified	8/442 (1.8)
486	Pneumonia, organism unspecified	8/442 (1.8)
493	Asthma	8/442 (1.8)
571	Chronic liver disease and cirrhosis	7/442 (1.6)
410	myocardial infarction	7/442 (1.6)
599	Other disorders of urethra and urinary tract	7/442 (1.6)
425	Cardiomyopathy	7/442 (1.6)
244	Acquired hypothyroidism	7/442 (1.6)
255	Disorders of adrenal glands	7/442 (1.6)
288	Diseases of white blood cells	7/442 (1.6)
535	Gastritis and duodenitis	7/442 (1.6)
511	Pleurisy	7/442 (1.6)
576	Other disorders of biliary tract	7/442 (1.6)
714	Rheumatoid arthritis and other inflammatory polyarthropathies	6/442 (1.4)
491	Chronic bronchitis	6/442 (1.4)
799	Other ill-defined and unknown causes of morbidity and mortality	6/442 (1.4)
783	Symptoms concerning nutrition, metabolism, and development	6/442 (1.4)
284	Aplastic anemia and other bone marrow failure syndromes	6/442 (1.4)
574	Cholelithiasis	6/442 (1.4)
577	Diseases of pancreas	6/442 (1.4)
433	Occlusion and stenosis of precerebral arteries	6/442 (1.4)
733	Other disorders of bone and cartilage	6/442 (1.4)
788	Symptoms involving urinary system	5/442 (1.1)
268	Vitamin D deficiency	5/442 (1.1)
54	Herpes simplex	5/442 (1.1)
238	Neoplasm of uncertain behavior of other and unspecified sites and tissues	5/442 (1.1)
995	Anaphylactic shock and angioedema	5/442 (1.1)
135	Sarcoidosis	5/442 (1.1)
278	Other hyperalimentation	5/442 (1.1)
279	Disorders involving the immune mechanism	5/442 (1.1)
275	Disorders of mineral metabolism	5/442 (1.1)

593	Other disorders of kidney and ureter	5/442 (1.1)
286	Coagulation defects	5/442 (1.1)
720	Ankylosing spondylitis and other inflammatory spondylopathies	5/442 (1.1)
424	Other diseases of endocardium	5/442 (1.1)
601	Prostatitis	5/442 (1.1)
79	Viral and chlamydial infection in conditions classified elsewhere and of unspecified site	5/442 (1.1)
581	Nephrotic syndrome	4/442 (0.9)
444	Arterial embolism and thrombosis	4/442 (0.9)
562	Diverticula of intestine	4/442 (0.9)
572	Liver abscess and sequelae of chronic liver disease	4/442 (0.9)
782	Symptoms involving skin and other integumentary tissue	4/442 (0.9)
695	Erythematous conditions	4/442 (0.9)
345	Epilepsy and recurrent seizures	4/442 (0.9)
429	Ill-defined descriptions and complications of heart disease	4/442 (0.9)
357	Inflammatory and toxic neuropathy	4/442 (0.9)
242	Thyrotoxicosis with or without goiter	4/442 (0.9)
964	Poisoning by agents primarily affecting blood constituents	4/442 (0.9)
112	Candidiasis	4/442 (0.9)
162	Malignant neoplasm of trachea, bronchus, and lung	4/442 (0.9)
197	Secondary malignant neoplasm of respiratory and digestive systems	4/442 (0.9)
202	Other malignant neoplasms of lymphoid and histiocytic tissue	4/442 (0.9)
550	HERNIA OF ABDOMINOPELVIC CAVITY	4/442 (0.9)
680	Carbuncle and furuncle	4/442 (0.9)
696	Psoriasis and similar disorders	4/442 (0.9)
512	Pneumothorax	4/442 (0.9)
441	Aortic aneurysm and dissection	4/442 (0.9)
580	Acute glomerulonephritis	4/442 (0.9)
394	CHRONIC RHEUMATIC HEART DISEASE	3/442 (0.7)
591	Hydronephrosis	3/442 (0.7)
507	Pneumonitis due to solids and liquids	3/442 (0.7)
726	Peripheral enthesopathies and allied syndromes	3/442 (0.7)
459	Other disorders of circulatory system	3/442 (0.7)
277	Other and unspecified disorders of metabolism	3/442 (0.7)
724	Other and unspecified disorders of back	3/442 (0.7)
420	pericarditis	3/442 (0.7)
422	Acute myocarditis	3/442 (0.7)
185	Malignant neoplasm of prostate	3/442 (0.7)
484	Pneumonia in infectious diseases classified elsewhere	3/442 (0.7)
707	Chronic ulcer of skin	3/442 (0.7)
963	Poisoning by primarily systemic agents	3/442 (0.7)
70	Viral hepatitis	3/442 (0.7)
78	Other diseases due to viruses and Chlamydiae	3/442 (0.7)
117	Other mycoses	3/442 (0.7)
478	Other diseases of upper respiratory tract	3/442 (0.7)
10	TUBERCULOSIS	3/442 (0.7)

304	Drug dependence	3/442 (0.7)
389	Hearing loss	3/442 (0.7)
426	Conduction disorders	3/442 (0.7)
423	Other diseases of pericardium	3/442 (0.7)
492	Emphysema	3/442 (0.7)
729	Other disorders of soft tissues	3/442 (0.7)
590	Infections of kidney	3/442 (0.7)
711	Arthropathy associated with infections	3/442 (0.7)
289	Other diseases of blood and blood-forming organs	3/442 (0.7)
413	Angina pectoris	2/442 (0.5)
557	Vascular insufficiency of intestine	2/442 (0.5)
575	Other disorders of gallbladder	2/442 (0.5)
537	Other disorders of stomach and duodenum	2/442 (0.5)
435	Transient cerebral ischemia	2/442 (0.5)
455	Hemorrhoids	2/442 (0.5)
910	superficial, contusion, crushing injuries	2/442 (0.5)
693	Dermatitis due to substances taken internally	2/442 (0.5)
153	Malignant neoplasm of colon	2/442 (0.5)
386	Vertiginous syndromes and other disorders of vestibular system	2/442 (0.5)
784	Symptoms involving head and neck	2/442 (0.5)
252	Disorders of parathyroid gland	2/442 (0.5)
442	Other aneurysm	2/442 (0.5)
269	Other nutritional deficiencies	2/442 (0.5)
35	Erysipelas	2/442 (0.5)
437	Other and ill-defined cerebrovascular disease	2/442 (0.5)
622	Noninflammatory disorders of cervix	2/442 (0.5)
458	Hypotension	2/442 (0.5)
454	Varicose veins	2/442 (0.5)
457	Noninfectious disorders of lymphatic channels	2/442 (0.5)
303	Alcohol dependence syndrome	2/442 (0.5)
291	Substance-induced mental disorders	2/442 (0.5)
331	Other cerebral degenerations	2/442 (0.5)
42	Human immunodeficiency virus [HIV] disease	2/442 (0.5)
540	Appendicitis	2/442 (0.5)
614	Inflammatory disease of ovary, fallopian tube, pelvic cellular tissue, and peritoneum	2/442 (0.5)
355	Mononeuritis of lower limb	2/442 (0.5)
198	Secondary malignant neoplasm of other specified sites	2/442 (0.5)
379	Other disorders of eye	2/442 (0.5)
370	Keratitis	2/442 (0.5)
704	Diseases of hair and hair follicles	2/442 (0.5)
481	PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA	2/442 (0.5)
791	Nonspecific findings on examination of urine	2/442 (0.5)
582	Chronic glomerulonephritis	1/442 (0.2)
713	Arthropathy associated with other disorders classified elsewhere	1/442 (0.2)
436	Acute, but ill-defined cerebrovascular disease	1/442 (0.2)

---

274	Gout	1/442 (0.2)
618	Genital prolapse	1/442 (0.2)
617	Endometriosis	1/442 (0.2)
840	Sprains and strains	1/442 (0.2)
342	Hemiplegia and hemiparesis	1/442 (0.2)
681	Superficial cellulitis and abscess	1/442 (0.2)
293	Transient mental disorders due to conditions classified elsewhere	1/442 (0.2)
136	Other and unspecified infectious and parasitic diseases	1/442 (0.2)
335	Anterior horn cell disease	1/442 (0.2)
796	Other nonspecific abnormal findings	1/442 (0.2)
570	Acute and subacute necrosis of liver	1/442 (0.2)
781	Symptoms involving nervous and musculoskeletal systems	1/442 (0.2)
586	RENAL FAILURE NOS	1/442 (0.2)
588	Disorders resulting from impaired renal function	1/442 (0.2)
443	Other peripheral vascular disease	1/442 (0.2)
513	Abscess of lung and mediastinum	1/442 (0.2)
519	Other diseases of respiratory system	1/442 (0.2)
465	Acute upper respiratory infections of multiple or unspecified sites	1/442 (0.2)
715	Osteoarthritis and allied disorders	1/442 (0.2)
712	Crystal arthropathies	1/442 (0.2)
596	Other disorders of bladder	1/442 (0.2)
505	PNEUMOCONIOSIS NOS	1/442 (0.2)
508	Respiratory conditions due to other and unspecified external agents	1/442 (0.2)
273	Disorders of plasma protein metabolism	1/442 (0.2)
431	INTRACEREBRAL HEMORRHAGE	1/442 (0.2)
434	Occlusion of cerebral arteries	1/442 (0.2)
438	Late effects of cerebrovascular disease	1/442 (0.2)
619	Fistula involving female genital tract	1/442 (0.2)
621	Disorders of uterus, not elsewhere classified	1/442 (0.2)
626	Disorders of menstruation and other abnormal bleeding from female genital tract	1/442 (0.2)
627	Menopausal and postmenopausal disorders	1/442 (0.2)
728	Disorders of muscle, ligament, and fascia	1/442 (0.2)
494	Bronchiectasis	1/442 (0.2)
215	Other benign neoplasm of connective and other soft tissue	1/442 (0.2)
220	Benign neoplasm of ovary	1/442 (0.2)
223	Benign neoplasm of kidney and other urinary organs	1/442 (0.2)
228	Hemangioma and lymphangioma, any site	1/442 (0.2)
217	Benign neoplasm of breast	1/442 (0.2)
212	Benign neoplasm of respiratory and intrathoracic organs	1/442 (0.2)
723	Other disorders of cervical region	1/442 (0.2)
452	Portal vein thrombosis	1/442 (0.2)
158	Malignant neoplasm of retroperitoneum and peritoneum	1/442 (0.2)
154	Malignant neoplasm of rectum, rectosigmoid junction, and anus	1/442 (0.2)
421	endocarditis	1/442 (0.2)
383	Mastoiditis and related conditions	1/442 (0.2)

---

380	Disorders of external ear	1/442 (0.2)
312	Conduct disorders	1/442 (0.2)
307	Eating disorders	1/442 (0.2)
308	Acute reaction to stress	1/442 (0.2)
339	Other headache syndromes	1/442 (0.2)
290	Dementias	1/442 (0.2)
295	Schizophrenic disorders	1/442 (0.2)
188	Malignant neoplasm of bladder	1/442 (0.2)
180	Malignant neoplasm of cervix uteri	1/442 (0.2)
184	Malignant neoplasm of other and unspecified female genital organs	1/442 (0.2)
333	Other extrapyramidal disease and abnormal movement disorders	1/442 (0.2)
330	Cerebral degenerations usually manifest in childhood	1/442 (0.2)
332	Parkinson's disease	1/442 (0.2)
336	Other diseases of spinal cord	1/442 (0.2)
600	Hyperplasia of prostate	1/442 (0.2)
49	Other non-arthropod-borne viral diseases of central nervous system	1/442 (0.2)
91	Syphilis	1/442 (0.2)
101	Vincent's angina	1/442 (0.2)
174	Malignant neoplasm of female breast	1/442 (0.2)
391	Rheumatic fever with heart involvement	1/442 (0.2)
642	Hypertension complicating pregnancy, childbirth, and the puerperium	1/442 (0.2)
940	BURNS	1/442 (0.2)
955	Injury to peripheral nerve(s) of shoulder girdle and upper limb	1/442 (0.2)
325	Phlebitis and thrombophlebitis of intracranial venous sinuses	1/442 (0.2)
321	Meningitis due to other organisms	1/442 (0.2)
352	Disorders of other cranial nerves	1/442 (0.2)
359	Muscular dystrophies and other myopathies	1/442 (0.2)
353	Nerve root and plexus disorders	1/442 (0.2)
350	Trigeminal nerve disorders	1/442 (0.2)
354	Mononeuritis of upper limb and mononeuritis multiplex	1/442 (0.2)
745	Bulbus cordis anomalies and anomalies of cardiac septal closure	1/442 (0.2)
748	Anomalies of respiratory system, congenital	1/442 (0.2)
746	Other congenital anomalies of heart	1/442 (0.2)
747	Other congenital anomalies of circulatory system	1/442 (0.2)
476	Chronic laryngitis and laryngotracheitis	1/442 (0.2)
473	Chronic sinusitis	1/442 (0.2)
526	Diseases of the jaws	1/442 (0.2)
523	Gingival and periodontal diseases	1/442 (0.2)
525	Other diseases and conditions of the teeth and supporting structures	1/442 (0.2)
528	Diseases of the oral soft tissues, excluding lesions specific for gingiva and tongue	1/442 (0.2)
161	Malignant neoplasm of larynx	1/442 (0.2)
196	Secondary and unspecified malignant neoplasm of lymph nodes	1/442 (0.2)
203	Multiple myeloma and immunoproliferative neoplasms	1/442 (0.2)
6	Amebiasis	1/442 (0.2)
5	Other food poisoning (bacterial)	1/442 (0.2)

---

75	INFECTIOUS MONONUCLEOSIS	1/442 (0.2)
53	Herpes zoster	1/442 (0.2)
235	Neoplasm of uncertain behavior of digestive and respiratory systems	1/442 (0.2)
366	Cataract	1/442 (0.2)
364	Disorders of iris and ciliary body	1/442 (0.2)
378	Strabismus and other disorders of binocular eye movements	1/442 (0.2)
377	Disorders of optic nerve and visual pathways	1/442 (0.2)
369	Blindness and low vision	1/442 (0.2)
245	Thyroiditis	1/442 (0.2)
241	Nontoxic nodular goiter	1/442 (0.2)
969	Poisoning by psychotropic agents	1/442 (0.2)
962	Poisoning by hormones and synthetic substitutes	1/442 (0.2)
965	Poisoning by analgesics, antipyretics, and antirheumatics	1/442 (0.2)
701	Other hypertrophic and atrophic conditions of skin	1/442 (0.2)
706	Diseases of sebaceous glands	1/442 (0.2)
709	Other disorders of skin and subcutaneous tissue	1/442 (0.2)
487	Influenza	1/442 (0.2)
568	Other disorders of peritoneum	1/442 (0.2)

---

Name	vhTPMTa n = 76	Other TPMTa n = 366	Odds-ratio [95%CI]	p-value	FDR threshold
<b>Iron deficiency anemia</b>	<b>15/57(26.3)</b>	<b>26/289(9)</b>	<b>3.6 [1.8-7.4]</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0008</b>
<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>8/70(11.4)</b>	<b>8/328(2.4)</b>	<b>5.2 [1.9-14.3]</b>	<b>0.00156</b>	<b>0.00161</b>
Secondary hypertension	6/57(10.5)	6/286(2.1)	5.5 [1.7-17.7]	0.0043	0.0024
Other and unspecified anemias	10/52(19.2)	21/284(7.4)	3 [1.3-6.8]	0.0091	0.0032
Gastrointestinal hemorrhage	8/55(14.5)	17/289(5.9)	2.7 [1.1-6.7]	0.0283	0.004
Acute bronchitis and bronchiolitis	4/63(6.3)	5/322(1.6)	4.3 [1.1-16.5]	0.0334	0.0048
Acute renal failure	10/60(16.7)	25/308(8.1)	2.3 [1-5]	0.0433	0.0056

Name	vhTPMTa n = 76	Other TPMTa n = 366	Odds-ratio [95%CI]	p-value	FDR threshold
Nutritional anemia	15/57(26.3)	26/284(9.2)	3.5 [1.7-7.2]	0.0005	0.0014
Diabetes mellitus	8/51(15.7)	8/254(3.1)	5.7 [2-16.1]	0.00093	0.00289
Aplastic and other anemias	10/52(19.2)	24/282(8.5)	2.6 [1.1-5.7]	0.0224	0.0043
Other acute lower respiratory infections	4/54(7.4)	5/278(1.8)	4.4 [1.1-16.8]	0.0322	0.0058



Name	lowTPMTa n = 42	Other TPMTa n = 400	Odds-ratio [95%CI]	p-value	FDR threshold
Symptoms involving digestive system	4/32(12.5)	9/271(3.3)	4.2 [1.2-14.4]	0.02	0.0008
Nonspecific abnormal findings on radiological and other examination of body structure	3/38(7.9)	6/332(1.8)	4.7 [1.1-19.4]	0.03	0.0016
Other disorders of kidney and ureter	2/37(5.4)	3/334(0.9)	6.3 [1-39]	0.04	0.002

Name	lowTPMTa n = 42	Other TPMTa n = 400	Odds-ratio [95%CI]	p-value	FDR threshold
Mycoses	3/34(8.8)	2/292(0.7)	14 [2.3-87.2]	0.0046	0.001
Persons with potential health hazards related to socioeconomic and psychosocial circumstances	3/17(17.6)	4/137(2.9)	7.1 [1.4-35.1]	0.0158	0.002
Abnormal findings on diagnostic imaging and in function studies, without diagnosis	3/29(10.3)	6/259(2.3)	4.9 [1.1-20.6]	0.0317	0.004
Infections of the skin and subcutaneous tissue	2/36(5.6)	3/333(0.9)	6.5 [1-40.1]	0.0448	0.005
Spondylopathy	3/32(9.4)	7/287(2.4)	4.1 [1-16.9]	0.0477	0.007

Biological tests	Global approach			Frequency-based approach			
	lowTPMTa n = 42 (%)	nTPMTa + vhTPMTa n = 400 (%)	Odds Ratio [95%CI]	p value	vhTPMTa encounter frequency	nTPMTa + lowTPMTa encounter frequency	p value
Leukocyte count	6/42(14.3)	98/394(24.9)	0.5 [0.2-1.3]	0.2	<b>0.037</b>	<b>0.104</b>	<b>0.002</b>
Neutrophil count	3/41(7.3)	41/392(10.5)	0.7 [0.1-2.3]	0.8	<b>0.009</b>	<b>0.027</b>	<b>0.013</b>
Red blood cell count	32/42(76.2)	340/394(86.3)	0.5 [0.2-1.2]	0.1	0.63	0.732	0.151
Hemoglobin	9/42(21.4)	116/394(29.4)	0.7 [0.3-1.5]	0.4	0.076	0.109	0.356
Mean corpuscular volume	16/42(38.1)	186/394(47.2)	0.7 [0.3-1.4]	0.3	0.299	0.33	0.661
Platelet count	3/42(7.1)	24/394(6.1)	1.2 [0.2-4.2]	0.7	0.032	0.022	0.706
Glycemia	31/35(88.6)	301/327(92)	0.7 [0.2-2.8]	0.5	0.738	0.763	0.674
Alkaline phosphatase	13/39(33.3)	129/368(35.1)	0.9 [0.4-1.9]	1	0.184	0.184	0.991

Biological test	Global approach *			p value	Frequency-based approach **		
	lowTPMTa n = 42 (%)	nTPMTa + vhTPTMa n = 400 (%)	Odds Ratio [IC95]		vhTPMTa encounter frequency	nTPMTa + lowTPTMa encounter frequency	p value
Leukocyte count	33/42(78.6)	258/394(65.5)	1.9 [0.9-4.7]	0.1	0.479	0.368	0.059
Neutrophil count	24/41(58.5)	188/392(48)	1.5 [0.8-3.1]	0.3	0.23	0.207	0.628
Red blood cell count	2/42(4.8)	26/394(6.6)	0.7 [0.1-3]	1	0.01	0.02	0.267
Hemoglobin	3/42(7.1)	26/394(6.6)	1.1 [0.2-3.8]	0.8	0.009	0.018	0.205
Mean corpuscular volume	14/42(33.3)	148/394(37.6)	0.8 [0.4-1.7]	0.6	0.206	0.227	0.702
Platelet count	19/42(45.2)	171/394(43.4)	1.1 [0.5-2.1]	0.9	0.178	0.215	0.447
<b>Glycemia</b>	1/34(2.9)	24/311(7.7)	0.4 [0-2.4]	0.5	<b>0.01</b>	<b>0.041</b>	<b>0.003</b>
Alkaline phosphatase	21/39(53.8)	166/368(45.1)	1.4 [0.7-2.9]	0.3	0.344	0.282	0.351
Alanine aminotransferase	12/41(29.3)	98/373(26.3)	1.2 [0.5-2.5]	0.7	0.152	0.099	0.269
Aspartate aminotransferase	8/41(19.5)	63/373(16.9)	1.2 [0.5-2.8]	0.7	0.076	0.058	0.582
Gamma glutamyl-transpeptidase	11/38(28.9)	89/369(24.1)	1.3 [0.6-2.8]	0.6	0.165	0.127	0.476



## Article 4

---

### **Bases moléculaires de la résistance aux thiopurines : identification d'une signature transcriptomique à partir de lignées cellulaires lymphoblastoïdes**

Laurent Chouchana <sup>1,2</sup>, Ana Fernández-Ramos <sup>1,2</sup>, Florent Dumont <sup>2,3</sup>, Catherine Marchetti <sup>1,2</sup>, Irène Ceballos-Picot <sup>2,5</sup>, Philippe Beaune <sup>1,2,4</sup>, David Gurwitz <sup>6</sup>, Marie-Anne Lorient <sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR-S 1147. Paris, France.

<sup>2</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité. Paris, France.

<sup>3</sup> INSERM U1016, Institut Cochin. Paris, France.

<sup>4</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochimie Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire. Paris, France.

<sup>5</sup> Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Biochimie Métabolique. Paris, France.

<sup>6</sup> Department of Human Molecular Genetics and Biochemistry, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University. Tel-Aviv, Israel

### **Contexte**

La 6-MP fait partie des médicaments de référence des phases de consolidation et de maintenance dans le traitement des LAL [PUI & EVANS 2006]. La phase de maintenance est essentielle pour établir une rémission sur le long terme et éviter la réémergence de clones lymphoblastiques résistants. Par ailleurs, il a été récemment démontré que, même dans un contexte de polychimiothérapie, les rechutes sont souvent associées à un médicament spécifique, avec notamment une importance toute particulière pour la sensibilité à la 6-MP pour le pronostic dans les LAL-T [BEESLEY *et al.* 2013]. Ainsi, la compréhension des bases moléculaires de la résistance aux thiopurines est essentielle pour prévenir les rechutes.

L'utilisation des LCL pour l'étude des thiopurines semble pertinente, les lymphoblastes étant, *in vivo*, la cible des thiopurines. De même, dans le cadre d'un traitement immunosuppresseur chez les patients ayant une MICI, les lymphocytes sont la cible cellulaire des thiopurines, et leur apoptose est requise pour obtenir une immunosuppression [TIEDE *et al.* 2003]. Ainsi, les LCL constituent un modèle cellulaire novateur de plus en plus utilisé en pharmacogénomique pour l'identification de marqueurs génétiques impliqués dans la réponse à un médicament. Elles ont principalement été utilisées dans le domaine des anticancéreux et des immunosuppresseurs [HUANG *et al.* 2007; LI *et al.* 2008; WU *et al.* 2011]. Grâce à l'apport des études de profilage transcriptomiques global, les LCL obtenues à partir d'individus sains présentent l'avantage de permettre l'analyse de voies métaboliques impliquées dans la réponse à un médicament, en lien avec des variations génomiques. La caractérisation phénotypique des LCL, en termes de sensibilité relative à un médicament, est fondée sur l'inhibition de la prolifération cellulaire mesurée à l'aide d'un test de MTS de mortalité cellulaire après un traitement médicamenteux de 72 heures. Ainsi, la comparaison du transcriptome, à l'aide de puces pangénomiques, entre les lignées « résistantes » et « sensibles » à un médicament permet d'identifier des profils transcriptomiques et des voies métaboliques associées à ces phénotypes opposés.

Dans la littérature, une étude de Fridley *et al.* sur des LCL a identifié des voies métaboliques associées à la réponse aux thiopurines [FRIDLEY *et al.* 2011]. Cependant cette étude d'association était fondée sur des variations de la concentration en thiopurine inhibant 50 % de la prolifération cellulaire sur un large panel de LCL, et, à ce jour, aucune étude n'a plus spécifiquement analysé la résistance aux thiopurines dont l'intérêt est pourtant majeur dans les LAL.

### **Objectifs et méthodologie**

Ce travail de recherche avait pour but l'identification de gènes impliqués dans la résistance aux thiopurines, ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents.

Nous avons travaillé sur un panel de 53 LCL provenant d'une collaboration avec Tel-Aviv University (cf. *material transfer agreement*, Annexe 6). Nous avons caractérisé la sensibilité de ces lignées cellulaires suite à un traitement de 72 heures par 2  $\mu$ M de 6-MP

et par 5  $\mu$ M d'azathioprine. Nous avons ensuite sélectionné les lignées ayant un phénotype « extrême » en fonction du résultat du test MTS de sensibilité – soit 5 lignées « résistantes » et 6 lignées « sensibles ». Nous avons également phénotypé 6 lignées provenant de patients ayant un syndrome de Lesch-Nyhan porteur d'un déficit génétique en HPRT, constituant une validation du phénotype « résistant ».

Dans un premier temps, nous avons effectué une étude ciblée de la TPMT et l'HPRT, principales enzymes du métabolisme des thiopurines. Dans un second temps, nous avons réalisé une analyse transcriptomique globale sur puce (Affymetrix Human Gene 2.0ST) et comparé l'expression relative de chaque gène dans les lignées « résistantes » par rapport aux lignées « sensibles », à l'aide d'un test *t* de Student. Une analyse fonctionnelle bioinformatique des gènes significativement différentiellement exprimés ( $p < 0,01$ ) a ensuite été effectuée en se basant sur la *Gene Ontology* (GO) et sur *Ingenuity Pathway Analysis*®. De plus, une signature transcriptomique définissant les lignées résistantes a été établie grâce à un algorithme classant. Enfin, nous avons mesuré des facteurs confondants pouvant biaiser l'interprétation des résultats, tels que le nombre de copies d'ADN mitochondrial et de l'EBV, la quantité d'ATP intracellulaire ou encore la vitesse de prolifération basale des lignées cellulaires [CHOY *et al.* 2008; STARK *et al.* 2010].

### **Principaux résultats et discussion**

Nos résultats montrent une excellente corrélation entre l'inhibition de la prolifération suite à un traitement par 6-MP ou par azathioprine ( $r=0,95$  ;  $p < 0,0001$ ), reflétant un phénotype similaire pour ces deux médicaments pour une lignée donnée. Les LCL provenant de patients ayant un syndrome de Lesch-Nyhan ont une activité HPRT indétectable et sont, comme attendu, quasiment totalement résistantes aux thiopurines. Concernant l'étude ciblée des enzymes du métabolisme des thiopurines, les lignées sensibles ont une activité TPMT significativement ( $p=0,024$ ) plus faible que les lignées résistantes, alors que nous n'avons pas trouvé de différence dans l'activité HPRT. Il est bien connu que les patients ayant une activité TPMT diminuée présentaient une plus forte sensibilité aux thiopurines se traduisant à la fois par des toxicités et des rémissions plus fréquentes [EVANS *et al.* 2001; LENNARD *et al.* 1990]. Au total, l'étude des thiopurines à l'aide d'un modèle de LCL semble donc conforter ces données et permet de reproduire, *in vitro*, des variations de réponse aux thiopurines observées cliniquement.



L'analyse transcriptomique globale nous a permis d'identifier, à l'aide d'un algorithme classant, une signature transcriptomique de 32 gènes – 22 gènes surexprimés et 10 gènes sous-exprimés –, validée par qPCR, permettant de discriminer les lignées résistantes des lignées sensibles. Cette signature transcriptomique inclut notamment une sous-expression de *GTPBP4*, une protéine nucléolaire liant le GTP et interagissant avec p53, et dont l'inactivation dans un modèle de drosophile est associée à une activation de p53 [LUNARDI *et al.* 2010]. Dans le même sens, notre signature comporte une expression augmentée d'un gène cible de p53, *TNFRSF10D*, qui a été décrite dans des cas de résistance aux chimiothérapies [LIU *et al.* 2005].

Par ailleurs, les fonctions biologiques selon la classification GO prenant en compte les gènes différentiellement exprimés étaient principalement la « prolifération cellulaire » et des « processus liés à l'ARN ». Une analyse bioinformatique fonctionnelle de ces gènes a révélé notamment une activation de la voie ATM/p53/p21 dans les lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles. Cette voie, activée en réponse à des dommages à l'ADN tels que l'incorporation d'un nucléotide à thioguanine par exemple, entraîne une inhibition des complexes cyclines-CDK2 et -CDK4 résultant en un arrêt ou ralentissement du cycle cellulaire [CHEN *et al.* 2014; KOSTER *et al.* 2010]. De plus, une surexpression du gène *CCNG2*, régulateur négatif du cycle cellulaire, activé en cas d'arrêt du cycle cellulaire ou d'apoptose en lien avec des dommages à l'ADN, a été également retrouvée dans les lignées résistantes [BENNIN *et al.* 2002]. Cette surexpression pourrait entraîner un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, ne permettant pas au système de réparation des mésappariements (*mismatch repair*, MMR) de l'ADN, indispensable à l'action des thiopurines, d'exercer son effet. Enfin, de manière intéressante, une sous-expression d'*ARHGDIA*, un inhibiteur d'échange de nucléotides à guanine régulant les formes inactives (Rho-GDP) des RhoGTPases, dont Rac1, a été retrouvée dans les lignées résistantes. Ces inhibiteurs séquestrent les formes inactives Rho-GDP dans le cytoplasme, les empêchant d'être recrutées à la membrane pour être activées [ETIENNE-MANNEVILLE & HALL 2002]. Ainsi, une diminution de la quantité d'*ARHGDIA* dans les lignées résistantes entraînerait une stabilisation de Rac1 sous forme potentiellement active à la membrane cellulaire, qui pourrait résulter en une moindre inhibition par le 6-TGTP. Ce mécanisme original pourrait réduire l'apoptose des lymphocytes induite par les thiopurines, *via* une inhibition de Rac1, et contribuer à la résistance aux thiopurines.

L'analyse des facteurs confondants n'a pas révélé de différences dans le nombre de copies d'ADNmt et de l'EBV, ou dans la quantité d'ATP intracellulaire. Nous avons observé que le taux de prolifération cellulaire basale tendait à être plus faible dans les lignées résistantes par comparaison avec les lignées sensibles ( $p=0,052$ ). Ce résultat est cohérent avec les variations transcriptomiques décrites ci-dessus, mais aussi avec une des hypothèses de G. Elion et G. Hitchings, étant que l'activité pharmacologique des thiopurines était associée à la réplication cellulaire [ELION 1989]. Leur but était de développer une molécule capable d'inhiber sélectivement la synthèse des acides nucléiques des cellules à division rapide, telles que les cellules leucémiques.

**Article soumis à *Molecular Cancer Therapeutics* (cf. pages suivantes)**

**« Molecular Insight into Thiopurine Resistance: Transcriptomic**

**Signature in Lymphoblastoid Cell Lines »**

Chouchana L, Fernández-Ramos AA, Dumont F, Marchetti C, Ceballos-Picot I, Beaune P, Gurwitz D, Lorient MA. *Soumis*.

RESULTATS CONFIDENTIELS  
NON PUBLIES LORS DE LA SOUTENANCE

## Article 5

---

### **Optimisation thérapeutique de l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin en pédiatrie**

*Note : les résultats de ce travail de recherche, qui devraient faire l'objet d'une publication prochainement, sont encore en cours d'analyse en collaboration avec le Docteur Jean-Louis Golmard (Département de Biostatistiques, Hôpital Pitié-Salpêtrière)*

*Les parties « Patients and methods » et « Results » sont présentées telles que dans la futur publication en cours de préparation.*

#### **Contexte**

Notre base de données pharmacogénétiques (cf. Article 2) nous a permis d'identifier un groupe de patients pédiatriques ayant une MICI pris en charge dans le service de Gastroentérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques (Pr. Frank Ruemmele) de l'Hôpital Necker-Enfants Malades à Paris. Ces patients pédiatriques constituaient un groupe homogène avec un suivi clinico-biologique régulier.

L'azathioprine est un médicament central du maintien de la rémission dans les MICI pédiatriques, utilisé en première intention selon les recommandations européennes de l'ESPGHAN [RUEMMELE *et al.* 2014; TURNER *et al.* 2012]. Les alternatives thérapeutiques de second recours sont uniquement représentées par le méthotrexate et les anti-TNF $\alpha$ , dont les effets indésirables au long cours sont mal connus chez l'enfant. En effet, les traitements du maintien de la rémission dans les MICI sont des traitements au long cours, voire parfois administrés tout au long de la vie. Les enjeux de la rémission sont particulièrement importants en pédiatrie. En effet, en plus des signes cliniques communs aux adultes, les MICI pédiatriques entraînent des malabsorptions responsables d'une cassure de la courbe de croissance. De plus, en phase active, elles peuvent être responsables d'un absentéisme scolaire prolongé allant jusqu'à un risque de rupture scolaire aux conséquences sociales ultérieures non négligeables. Ainsi, l'optimisation thérapeutique de l'azathioprine est

particulièrement nécessaire en pédiatrie, notamment à l'aide d'un algorithme thérapeutique, afin de réduire le risque de toxicités chez ces patients et d'augmenter l'efficacité. De plus, les études cliniques sur l'utilisation de la pharmacogénétique et du STP en pédiatrie dans les MICI sont peu nombreuses dans la littérature [KOPYLOV *et al.* 2014; MARKOWITZ *et al.* 2000; NGUYEN *et al.* 2013a, 2013b, 2013c; RIELLO *et al.* 2011].

En partenariat avec l'Unité de recherche clinique Cochin-Necker (Pr. Jean-Marc Tréluyer) nous avons mis en place une étude clinique rétrospective – protocole REFAZAME – dont l'objectif principal était la recherche de facteurs de risques biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques impliqués dans la survenue de toxicités suite à un traitement par azathioprine dans les 6 mois après son instauration (cf. Annexe 7). De plus, l'objectif final était la détermination d'une posologie optimale (bénéfice/risque) d'azathioprine en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques pour le maintien de la rémission.

Ce protocole de recherche a reçu un avis favorable par le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France II (cf. Annexe 8).

RESULTATS CONFIDENTIELS  
NON PUBLIES LORS DE LA SOUTENANCE

## **Analyse des résultats et perspectives de discussion**

Les résultats préliminaires de cette étude clinique rétrospective, incluant 247 patients suivis 24 mois, ont permis de caractériser les facteurs influençant l'efficacité et les toxicités de l'azathioprine sur les MICI en pédiatrie.

### **Efficacité**

Nous avons retrouvé des taux de réponses à l'azathioprine similaires à ceux décrits dans les autres études pédiatriques [DUBINSKY *et al.* 2000; NGUYEN *et al.* 2013c; RIELLO *et al.* 2011]. Le taux de réponse à l'azathioprine à 6 mois observé dans notre étude pour la maladie de Crohn (64 %) est également comparable à celui retrouvé chez l'adulte [PREFONTAINE *et al.* 2009]. Par contre, nous avons observé une efficacité à 6 mois (38 %) significativement plus faible pour les patients ayant une RCH ou une colite indéterminée ( $p < 0,0001$ ). Par ailleurs, seuls 172 (72,6 %) patients avaient encore de l'azathioprine à la fin de l'étude, soit 24 mois après le début du traitement. Parmi les patients ayant arrêté l'azathioprine avant la fin de l'étude, 27 (11,3 %) l'ont fait pour inefficacité, avec un relai de traitement principalement par le méthotrexate ou l'infliximab, et 18 (7,6 %) pour effets indésirables au cours de la période de suivi. Même si le nombre de patients interrompant l'azathioprine pour inefficacité est relativement faible, le taux de réponse à 6 mois suggère qu'une part importante de patients reçoit encore un traitement de l'induction de la rémission. Ces traitements de l'induction de la rémission (majoritairement la nutrition entérale exclusive dans la maladie de Crohn ou la prednisone dans la RCH) ont des conséquences délétères sur la qualité de vie des patients pédiatriques ou sur leur courbe de croissance. L'optimisation thérapeutique est donc essentielle pour augmenter la rémission sous azathioprine.

L'analyse des facteurs prédictifs de la réponse à 6 mois a montré que les patients répondeurs semblaient avoir une maladie moins active au moment de l'initiation du traitement par thiopurines (CRP basse, albumine et hémoglobine élevées), et être plus âgés que les patients non-répondeurs. De plus, ces derniers avaient à 6 mois une hémoglobine et un volume globulaire plus faibles, alors que les plaquettes étaient plus élevées, par comparaison aux patients en rémission. Ces signes biologiques sont en lien avec des saignements plus actifs chez les patients non-répondeurs. Par ailleurs, les métabolites actifs des thiopurines entraînant une diminution des leucocytes et des

polynucléaires neutrophiles, des valeurs plus élevées pour ces paramètres chez les non-répondeurs par rapport aux répondeurs pourraient témoigner d'une moins bonne efficacité des thiopurines. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de concentrations en 6-TGN entre ces deux groupes de patients (277 [191-397] vs. 224 [157-330] pmol/8x10<sup>8</sup> GR ; p=0,068). Cela pourrait s'expliquer par un manque de puissance de l'étude, due au fait que tous les patients n'avaient pas de détermination des 6-TGN à 6 mois correspondant à la visite d'évaluation permettant la classification d'un patient comme répondeur ou non-répondeur. En effet, contrairement à d'autres études rapportant une corrélation entre 6-TGN et réponse aux thiopurines, nous avons analysé les 6-TGN à 6 mois uniquement, et non pas pour toutes les évaluations de l'efficacité lors de chacune des visites médicales [DUBINSKY *et al.* 2000; NGUYEN *et al.* 2013b]. Néanmoins, indépendamment de la significativité, cette différence est relativement faible ( $\approx$  50 pmol/8x10<sup>8</sup> GR) remettant en cause l'existence d'un seuil thérapeutique pour les 6-TGN et suggérant un rôle potentiel pour d'autres métabolites, notamment les 6-TGTP.

### Effets indésirables

#### *Toxicité pancréatique*

La toxicité pancréatique induite par l'azathioprine a été observée chez 11 (4,6 %) patients, principalement durant les 6 premières semaines de traitement et a entraîné l'arrêt du traitement chez plus de la moitié de ces patients. La précocité et la prévalence de la toxicité pancréatique, probablement en lien avec un mécanisme immuno-allergique, sont en accord avec une étude clinique récente sur les pancréatites aux thiopurines [HEAP *et al.* 2014].

#### *Toxicité hépatique*

Une augmentation modérée des transaminases a été observée chez 18 (7,5 %) des patients, dont la survenue a été associée à la présence concomitante de prednisone (p=0,0004). Par ailleurs, il y avait une tendance non significative à une fréquence augmentée de toxicités hépatiques parmi les patients ayant une activité TPMT très élevée par rapport aux autres patients (16,7 % vs. 6,1 %; p=0,09). Bien que les concentrations des métabolites 6-TGN et 6-MMPN n'étaient pas séparément associées à la toxicité



hépatique, nous avons observé qu'il y avait approximativement 6 fois plus de risque de développer une hépatotoxicité en présence d'un ratio 6-MMPN:6-TGN défavorable ( $\geq 20$ ) (30,1 % vs. 6,6 %; OR, IC95 %: 6,3, [2,8-13,8] ;  $p < 0,0001$ ). Ce résultat est en accord avec les résultats de notre base de données et avec la littérature : si l'activité TPMT n'est probablement pas le déterminant majeur du ratio métabolique, une activité TPMT très élevée est, du moins en partie, responsable d'un ratio défavorable [VAN EGMOND *et al.* 2012]. Ainsi, la prédiction de la toxicité hépatique serait peut être plus efficace en utilisant le ratio métabolique qu'en prenant en compte uniquement la concentration en 6-MMPN comme proposé par Dubinsky *et al.* [DUBINSKY *et al.* 2000]. Ces patients pourraient tirer bénéfice d'une optimisation thérapeutique par ajout d'allopurinol, permettant une normalisation du bilan hépatique chez les patients ayant un ratio métabolique défavorable [LEONG *et al.* 2008; SMITH *et al.* 2012; SPARROW *et al.* 2007].

### *Toxicité hématologique*

La myélotoxicité rapportée 68 fois dans notre étude, principalement des cas de neutropénie, a été positivement associée au fer sérique. Nous n'avons pas retrouvé d'influence des concentrations en 6-TGN ou de l'activité TPMT sur la survenue de la toxicité hématologique.

### Lymphopénie

La lymphopénie, bien que déjà décrite lors de traitement par thiopurines ou d'autres immunosuppresseurs n'est pas considérée comme une toxicité hématologique des thiopurines dans la plupart des études et est plutôt considérée comme un effet associé à l'immunosuppression. A ce jour, elle a été peu étudiée dans le cadre des thiopurines, par comparaison avec les leuco-neutropénies. Cette altération biologique habituellement observée ne semble pas directement liée à la concentrations des métabolites 6TGN ou 6-MMPN, comme c'est le cas pour les neutropénies [AL RIFAI *et al.* 2011].

Nous avons observé des épisodes de lymphopénie chez 95 (40 %) patients, dont 32 cas de lymphopénie sévère avec des lymphocytes  $< 500/\text{mm}^3$ , avec une fréquence similaire à celle décrite dans une étude dans la littérature [AL RIFAI *et al.* 2011].

Le déficit complet en TPMT pourrait être un facteur prédisposant à la survenue précoce de lymphopénie dans les 3 premiers mois de traitement, même si le faible nombre de

patients (n=2) dans notre étude avec une lymphopénie et un déficit en TPMT ne permet pas de tirer des conclusions robustes (p=0,0005). De plus, la lymphopénie était associée à des concentrations significativement plus élevées en 6-TGN (293 [175-487] vs. 235 [162-329] pmol/8x10<sup>8</sup> GR; p=0,003). Une courbe ROC (AUC=0,61 ; p<0,0001) a montré qu'une concentration en 6-TGN de 360 pmol/8x10<sup>8</sup> GR avait une sensibilité de 38,6 % et une spécificité de 81,7 % pour prédire la survenue d'une lymphopénie. La faible sensibilité est en lien avec l'existence d'autres facteurs majeurs dans la survenue de la lymphopénie sous thiopurine. Ainsi, le taux de lymphocytes initial était prédictif de la survenue d'une lymphopénie aux thiopurines. Les patients possédant un taux de lymphocytes inférieur à 2500 /mm<sup>3</sup> lors de l'initiation du traitement par thiopurine avaient un risque relatif 3 fois plus important de développer une lymphopénie que les autres, avec un risque cumulé de 31 % à un an (HR 3,33, IC95% [1,58-4,30]). La présence de prednisone était également associée à la lymphopénie (p=0,0106).

Enfin, nos résultats (CRP, score HBI, fer sérique, albumine) montrent qu'une MICI évolutive, du moins dans le cas de la maladie de Crohn, pourrait être associée à la lymphopénie. Les travaux antérieurs de Nguyen *et al.* et Al Rifai *et al.*, ont suggéré que l'absence de lymphopénie était un signe de réponse clinique aux thiopurines [NGUYEN *et al.* 2013b; AL RIFAI *et al.* 2011]. Par ailleurs, le risque de lymphopénie étant également majoré en présence de prednisone, il est possible que l'association positive trouvée entre rémission et absence de lymphopénie soit, du moins en partie, due à l'absence de corticoïdes. Au final, la combinaison entre le taux de lymphocytes initial, la concentration en 6-TGN et la présence de corticoïdes au sein d'un même algorithme devrait aboutir à une prédiction plus fine du risque de lymphopénie chez les patients pédiatriques sous thiopurines.



# DISCUSSION GENERALE

---



Les thiopurines constituent l'une des meilleures illustrations de l'utilisation conjointe de la pharmacogénétique et du STP pour une optimisation thérapeutique dont l'intégration en pratique de soins courants représentent un réel succès avec plus de 3000 génotypages *TPMT* effectués en France en 2013 (données : Agence de Biomédecine, ne tenant pas compte du volume des phénotypages de la *TPMT*). En ce qui concerne les tests pharmacogénétiques, aux Etats-Unis la FDA recommande le dépistage des patients ayant un déficit d'activité *TPMT*, avant l'initiation d'un traitement par thiopurine, de manière à prévenir les leuco-neutropénies potentiellement létales [FDA 2011]. En Europe, une nouvelle formulation de 6-MP en solution orale (Xaluprine®) récemment autorisée par l'EMA, inclut dans son RCP une « mise en garde et précaution d'emploi » chez les patients ayant un déficit en *TPMT* et recommande un dépistage de ce déficit afin de réduire le risque de myélosuppression [EMA 2012b]. Le RCP français de l'azathioprine, mise sur le marché dans les années 1960, n'inclut aucune recommandation concernant la *TPMT* [ANSM 2010]. Cependant, ni l'EMA ni la FDA ne proposent d'adaptation posologique chez ces patients pourtant à haut risque de toxicité hématologique. Il existe par ailleurs aux Etats-Unis des recommandations émises par le CIPC pour l'adaptation de doses initiales en fonction du génotype *TPMT* : 30 à 70 % de la dose chez les hétérozygotes et 10 % de la dose 3 fois par semaine chez les homozygotes mutés [RELLING *et al.* 2011a, 2013]. Concernant le STP, permettant une surveillance en cours de traitement, il est fondé sur le dosage des métabolites actifs 6-TGN et 6-MMPN, dont les concentrations intra-érythrocytaires sont étroitement liées à l'efficacité et à certaines toxicités, hématologiques ou hépatiques. Le dépistage du déficit en *TPMT* et le STP ne se substituent pas à la numération sanguine et au dosage régulier des transaminases. La mesure de l'activité *TPMT* et le STP permettent d'appréhender l'importante variabilité inter-individuelle dans la réponse clinique aux thiopurines.

Cependant, la connaissance du métabolisme de thiopurines et des mécanismes d'action de ces molécules est encore partielle. En effet, les déficits en *TPMT* n'expliquent qu'un quart des myélosuppressions et les seuils des concentrations en 6-TGN et 6-MMPN restent débattus [BENKOV *et al.* 2013; COLOMBEL *et al.* 2000]. En outre, les causes de résistance aux thiopurines sont peu connues et sont à l'origine d'échecs thérapeutiques aux conséquences néfastes pour les patients [NGUYEN *et al.* 2013c]. Dans les MICI, l'azathioprine constitue le traitement de référence du maintien de la rémission dont l'efficacité a été démontrée au très long cours (64 mois) [LEMANN *et al.* 2005]. Cependant,

30 à 40 % des patients n'auront pas de réponse efficace et devront recevoir notamment des anti-TNF $\alpha$ , plus contraignant et plus coûteux. De plus, la 6-MP est une molécule centrale des phases de consolidation et de maintenance dans le traitement des LAL, et essentielle pour obtenir une rémission sur le long terme et éviter la réémergence de clones lymphoblastiques résistants [PUI & EVANS 2006].

L'exploration de facteurs génétiques prédictifs de la résistance est donc un enjeu majeur des traitements par thiopurines. L'optimisation de ces traitements reste un sujet d'intérêt compte tenu de la large prescription de ces médicaments et de leur efficacité indiscutable comme immunosuppresseurs dans les MICI et d'autres pathologies auto-immunes ou comme cytotoxiques dans les LAL.

Cette thèse avait pour objectif général une meilleure compréhension de la variabilité inter-individuelle de la réponse aux thiopurines – notamment de la résistance –, en vue de l'optimisation thérapeutique de ces médicaments. Nous avons pour cela combiné des approches cliniques et expérimentales : (i) d'une part, à partir de données biologiques et cliniques issues, respectivement, d'une expérience hospitalière en pharmacogénétique de plus de 10 ans relative aux thiopurines, et d'études rétrospectives bioinformatiques et cliniques, et (ii) d'autre part, d'un modèle *in vitro* de LCL permettant une analyse exploratoire de l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux thiopurines.

## 1 Optimisation thérapeutique des thiopurines

### ➤ *Phénotypage ou génotypage de la TPMT ?*

Nos travaux sur la base de données pharmacogénétiques, établie à partir de l'expérience hospitalière de l'Unité fonctionnelle de pharmacogénétique de l'HEGP, nous ont permis d'explorer la façon dont les outils d'optimisation thérapeutique que sont la TPMT et les métabolites thiopuriniques étaient utilisés en pratique de soins courants. Nous avons établi une corrélation génotype-phénotype pour la TPMT sur une très large population de patients. Sur la base des quatre principaux variants alléliques (*TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B*, *TPMT\*3C*) nous avons trouvé une concordance globale de 93,4 % entre le génotype et le phénotype. La VPP du génotypage pour la détection d'un déficit (partiel ou

complet) d'activité est de 77,4 % et la VPN de 95,4 %. Autrement dit, un peu moins de 5 % des patients ayant un génotype *TPMT* sauvage ont un déficit d'activité *TPMT*, probablement associé à la présence d'un variant peu fréquent ou d'une mutation rare. Ces patients recevront des doses standards de thiopurine à la suite du dépistage. De plus, leur médecin ayant reçu une information de risque « faible », cela pourrait l'inciter à diminuer la surveillance hématologique rendant cette situation à risque particulièrement élevé de survenue de myélosuppression. De plus, en présence d'un génotype *TPMT* hétérozygote, la concordance génotype-phénotype n'est que de 73,3 %. Par conséquent plus d'un quart des patients hétérozygotes pour la *TPMT* ont un phénotype mal prédit par le génotypage et sont porteurs, en majorité, d'une activité *TPMT* élevée. Ainsi, à partir de notre expérience hospitalière, comme nous l'avons proposé dans une lettre à l'Editeur de la revue *Journal of Crohn's and Colitis – TPMT status determination: The simplest is the most effective?* –, le phénotypage apparaît plus efficace que le génotypage pour le dépistage du déficit en *TPMT* (Annexe 2).

Par ailleurs, bien que le déficit d'activité *TPMT* soit en faveur d'une réponse efficace à un traitement par thiopurine, plusieurs études rapportent également un seuil d'activité au sein du phénotype rapide au-dessous duquel les remissions sont plus fréquentes [ANSARI *et al.* 2002a, 2008a; CUFFARI *et al.* 2004; LENNARD *et al.* 1990]. Ainsi, au-delà du rationnel génétique qui définit les seuils d'activité entre les différents phénotypes, déterminés par des corrélations génotype-phénotype, d'autres seuils pourraient être plus pertinents biologiquement et cliniquement, en lien avec des concentrations en métabolites actifs et la rémission clinique. La grande plage de valeurs de l'activité *TPMT* par comparaison à l'information du génotype permet, à l'aide des seuils déterminés dans la littérature, d'identifier plus précisément les patients susceptibles d'avoir une réponse efficace. Cependant, le phénotypage de l'activité *TPMT* dans les cytosols érythrocytaires, fondé sur le dosage par HPLC de la quantité de 6-MMP formée après incubation en présence d'une quantité connue de 6-MP, est plus compliqué à mettre en œuvre que le génotypage, habituellement restreint à la détection des trois principaux SNP. De plus, les seuils d'activité retrouvés dans la littérature sont différents d'une étude à l'autre. Ainsi, une standardisation des techniques de dosage serait nécessaire pour permettre une meilleure intégration de la *TPMT* comme marque prédictif de l'efficacité en pratique de soins courants. En perspective, étant donné qu'un patient sur deux ayant une MICI recevra un jour des thiopurines, il serait intéressant de phénotyper/génotyper la *TPMT* au moment



du diagnostic de MICI et d'inclure le résultat dans le dossier médical du patient, afin de pouvoir envisager dès le début toutes les éventualités thérapeutiques.

Par ailleurs, en plus des trois phénotypes originellement décrits par Weinshilboum *et al.* – lent (activité basse), intermédiaire (activité intermédiaire) et rapide (activité élevée) – nous avons identifié un 4<sup>ème</sup> groupe de patients ayant un phénotype ultra-rapide correspondant à une activité TPMT très élevée [WEINSHILBOUM & SLADEK 1980]. Jusqu'à présent, la très grande majorité des études de la littérature s'était plutôt focalisée sur les conséquences du déficit d'activité TPMT, associé à la présence de principaux variants alléliques (*TPMT\*2*, *TPMT\*3A*, *TPMT\*3B*, *TPMT\*3C*). Des patients ayant une activité TPMT très élevée – 7 à 15 % des patients – avaient déjà été identifiés dans des études précédentes [ANSARI *et al.* 2002a; SERPE *et al.* 2009; YAN *et al.* 2000]. Cependant, pour la première fois nous avons caractérisé ce groupe de patients au sein d'une très grande population. Dans la littérature, deux études rapportent la présence de séquences de nucléotides répétées de type VNTR dans le promoteur du gène *TPMT* qui pourraient moduler l'expression et ainsi l'activité TPMT [ROBERTS *et al.* 2008; SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE *et al.* 1998a]. Une régulation post-traductionnelle a également été proposée avec la SAM, co-facteur indispensable de la TPMT. La SAM stabilise la protéine et agit comme un modulateur positif de l'activité TPMT [MILEK *et al.* 2009]. Une étude *in vitro* a montré que l'ajout de SAM exogène permet de reverser les effets cytotoxiques de la 6-MP [MILEK *et al.* 2009]. A partir de prélèvements sanguins, il a également été montré que, chez les patients avec un génotype sauvage pour le gène *TPMT*, la concentration intracellulaire en SAM était significativement et positivement associée à l'activité TPMT [MILEK *et al.* 2012]. Les auteurs suggèrent que des modulations de concentrations intracellulaires en SAM pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'activité TPMT et expliquer, au moins en partie et chez certains patients, une activité TPMT très élevée. Ces variations de concentrations en SAM semblent cependant de faibles amplitudes et leur contribution à une activité TPMT très élevée est probablement faible [MILEK *et al.* 2012].

➤ *L'activité TPMT très élevée, un marqueur prédictif de la résistance aux thiopurines ?*

Une activité TPMT très élevée pourrait être responsable d'une déviation du métabolisme des thiopurines vers la formation des 6-MMP au détriment de la production des 6-TGN, en lien avec une résistance au traitement. Cette observation empirique issue du cas

clinique, nous a amené à mettre en place une étude bioinformatique fondée sur le CDW de l'HEGP. Ainsi, à partir de la transposition de la méthodologie novatrice du PheWAS à une variable quantitative catégorisée – l'activité TPMT –, nous avons exploré, sans *a priori*, les conséquences d'une activité TPMT très élevée sur le phénomène des patients traités par thiopurine pour une MICI. Cette étude a montré que les patients ayant une activité TPMT très élevée présentaient des signes de rechutes cliniques des MICI (anémie) et développaient des effets indésirables dus aux corticoïdes (diabète, hypertension secondaire), traitements de référence dans les poussées de MICI. Sur la base de ces résultats, nous avons formulé l'hypothèse que les patients avec une activité TPMT très élevée constituent un groupe de malades moins bons répondeurs que les autres patients. Cette hypothèse reste à valider à partir d'un autre CDW ou à l'aide d'une étude clinique prospective. Une augmentation des doses de thiopurine, en association avec une prise en charge et une surveillance clinico-biologique plus strictes, ou un changement de molécule précoce, pourraient sans doute être envisagés pour ces patients.

Par ailleurs, l'analyse de la base de données pharmacogénétiques n'a pas rapporté de concentrations intra-érythrocytaires plus faibles en 6-TGN chez les patients avec une activité TPMT très élevée. Les ratios 6-MMPN:6-TGN n'étaient également pas significativement plus élevés, même si une tendance est observée, chez les patients ayant une activité très élevée. La méthodologie de constitution de cette base de données, reflétant l'activité en rapport avec la TPMT d'une unité hospitalière de pharmacogénétique, peut expliquer ces résultats discordants avec l'étude bioinformatique. Les valeurs du dosage des métabolites proviennent du STP au cours duquel les posologies en thiopurines ont été, au moins en partie, adaptées. Néanmoins, au-delà d'un seuil d'activité à 18,3 U/mL, nous avons pu déterminer un risque significativement 3 fois plus élevé d'avoir un ratio défavorable, soulignant l'importance du phénotypage dans ces situations pour la compréhension et la prise en charge de la mauvaise réponse thérapeutique aux thiopurines. Ainsi, même si l'activité TPMT n'est pas le déterminant majeur du ratio 6-MMPN:6-TGN, le métabolisme des thiopurines est probablement dévié à partir d'une activité particulièrement très élevée, exposant ces patients à un risque de résistance aux thiopurines [VAN EGMOND *et al.* 2012].

➤ *Lymphopénie au cours d'un traitement par thiopurine, marqueur associé à l'efficacité ?*

L'efficacité des thiopurines est due, en partie, à une potentialisation de l'apoptose des lymphocytes T activés grâce à un mécanisme moléculaire impliquant le 6-TGTP [TIEDE *et al.* 2003]. Ainsi, comme tout médicament immunosuppresseur, les thiopurines sont responsables d'une lymphopénie associée. Cependant, la lymphopénie, pourtant présente chez un grand nombre de patients traités par thiopurines, n'a pas été beaucoup étudiée à ce jour par rapport aux leuco-neutropénies, effet indésirables majeurs de ces médicaments [NGUYEN *et al.* 2013b; AL RIFAI *et al.* 2011]. Les leuco-neutropénies ont même été décrites comme étant le reflet de l'efficacité des thiopurines [EVANS *et al.* 2001; LENNARD *et al.* 1990]. Des résultats préliminaires de notre étude clinique en pédiatrie (protocole REFAZAME) semblent montrer que la lymphopénie soit également associée à la réponse aux thiopurines. Ces résultats sont en accord avec deux autres études de la littérature [NGUYEN *et al.* 2013b; AL RIFAI *et al.* 2011]. Nous avons également identifié des facteurs prédictifs de la survenue d'une lymphopénie sous thiopurine, tels que le déficit en TPMT, un taux de lymphocytes avant le début du traitement inférieur à  $2500/\text{mm}^3$ , la prise de prednisone ou encore une concentration en 6-TGN supérieure à  $360 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ GR}$ . La lymphopénie pourrait probablement être mieux appréhendée avec la prise en compte de ces facteurs combinés au sein d'un algorithme. En effet, bien que probablement associée à l'efficacité du traitement, la lymphopénie prolongée est responsable d'infections voire de cancers viro-induits, dont la prévention est essentielle dans les traitements des maladies dysimmunitaires, notamment en pédiatrie.

➤ *Perspectives pour le dosage des métabolites thiopuriniques*

Nos travaux de recherche nous ont permis d'analyser les variations des métabolites des thiopurines en fonction de l'activité TPMT et d'autres facteurs (sexe, âge, doses d'azathioprine). Nous avons notamment trouvé des différences de concentrations en métabolites 6-MMPN en fonction du sexe. Ainsi, les femmes ont des concentrations intra-érythrocytaires en 6-MMPN et des ratios 6-MMPN:6-TGN respectivement 1,6 et 2,2 fois plus élevés que les hommes, alors que les concentrations en 6-TGN et les doses d'azathioprine et l'activité TPMT sont similaires. Ce résultat concernant les concentrations en 6-MMPN a également été mis en valeur à l'aide d'un modèle multivarié.

Ces différences en fonction du sexe, déjà retrouvées dans d'autres études mais peu explorées à ce jour, font poser l'hypothèse d'un pronostic de rémission plus faible chez les femmes.

Au cours d'un STP longitudinal, nous avons également observé une réduction d'environ 29 % du nombre de patients sous-dosés en 6-TGN. Cependant, après une durée médiane de suivi de 2,3 ans (IQR : [1,1-3,8]), la moitié des déterminations de 6-TGN étaient encore inférieures au seuil thérapeutique de 235 pmol/8x10<sup>8</sup> GR proposé historiquement par Dubinsky *et al.* [DUBINSKY *et al.* 2000]. Ce résultat suggère que ce seuil d'efficacité clinique des thiopurines n'est probablement pas optimal. Il est en effet difficilement imaginable que la moitié des patients sous thiopurine après plus de deux ans de traitement, et avec une prise en charge par STP, ne soit pas en rémission. Dans la littérature, cette concentration seuil (235 pmol/8x10<sup>8</sup> GR) reste largement débattue, certains auteurs remettant même en cause l'intérêt du STP pour l'efficacité thérapeutique [BENKOV *et al.* 2013; FRIEDMAN *et al.* 2012; VIKINGSSON *et al.* 2009]. Les résultats discordants sur le STP parmi les études peuvent s'expliquer par des différences entre les méthodes de dosage dans les globules rouges, le seuil de 230-260 pmol/8x10<sup>8</sup> GR ne pouvant s'appliquer qu'à la méthode de dosage de Lennard & Singleton [MOREAU *et al.* 2014]. En effet, en fonction de la technique employée pour effectuer l'hydrolyse acide des nucléotides 6-TGN, une quantité variable de 6-TG libérée sera dosée par HPLC. Shipkova *et al.* avaient retrouvé des concentrations de 6-TG 2,6 fois plus élevées après l'hydrolyse par acide perchlorique de Dervieux & Boulieu, par rapport à l'hydrolyse par acide sulfurique de Lennard & Singleton [SHIPKOVA *et al.* 2003]. Une standardisation des méthodes de dosage, par le biais des sociétés savantes, serait donc souhaitable de manière à uniformiser les recommandations thérapeutiques. Par ailleurs, les 6-TGN représentent une entité regroupant des nucléotides mono-, di- et triphosphorylés. Ainsi, les résultats discordants sur l'intérêt des 6-TGN comme biomarqueurs de l'efficacité peuvent également s'expliquer par le fait qu'au sein des 6-TGN, seul le nucléotide triphosphorylé, le 6-TGTP, est responsable de la réponse clinique [NEURATH *et al.* 2005; TIEDE *et al.* 2003]. Ce nucléotide triphosphorylé est le dernier métabolite d'une longue chaîne de métabolisation impliquant de nombreuses enzymes et se terminant par la NDPK [KARNER *et al.* 2010]. L'équilibre entre les formes mono-, di- et triphosphorylées est donc variable d'un individu à l'autre. Ainsi, un dosage différentiel des 6-TGN à l'aide d'une méthode HPLC par appariement d'ions à détection UV-fluorescence a été proposée afin de

déterminer précisément les concentrations respectives 6-TGMP, 6-TGDP, 6-TGTP chez les patients [VIKINGSSON *et al.* 2009, 2013]. Une étude clinique préliminaire, permettant de mieux appréhender le rôle de chacun de ces nucléotides, a montré que la présence prédominante de 6-TGTP, associée à des 6-TGDP inférieurs à 15 % des 6-TGN totaux, serait un facteur prédictif d'une réponse thérapeutique aux thiopurines [NEURATH *et al.* 2005]. L'intérêt du dosage du 6-TGTP dans le STP de l'efficacité des thiopurines nécessite une évaluation clinique plus large. Au total, même si les seuils des concentrations thérapeutiques restent débattus, le STP permet, *a minima*, d'expliquer les principales toxicités (hématologiques et hépatiques), ainsi qu'un dépistage des patients non-observants ou de ceux à risque de résistance pharmacologique.

➤ *Aspects économiques et éthiques*

En plus des aspects scientifiques précédemment discutés, des considérations économiques et éthiques sont à prendre en compte pour la généralisation de ces méthodes d'optimisation thérapeutique. Ainsi, une des principales limitations à l'incorporation en pratique clinique de la pharmacogénétique ou du STP des thiopurines repose sur l'accessibilité et le coût de ces analyses. Une enquête auprès de médecins experts dans les MICI à travers le monde a révélé que ces derniers considéraient comme utile le STP fondé sur le dosage intra-érythrocytaire des 6-TGN et 6-MMPN pour optimiser un traitement par thiopurine [ROBLIN *et al.* 2011]. Les médecins qui avaient accès au STP rapportaient moins de changements de traitement pour une autre classe pharmacologique. La principale raison limitant le recours au STP, hormis sa disponibilité, était son remboursement par les systèmes de santé [ROBLIN *et al.* 2011]. Ces deux paramètres, disponibilité et coût, soulèvent des questions éthiques et économiques. En effet, dès lors qu'un test n'est pas accessible à l'ensemble des patients pour des contraintes budgétaires, une inégalité de prise en charge peut apparaître. Peu d'études pharmaco-économiques permettant d'évaluer l'intérêt de la pharmacogénétique sont disponibles et le manque de données économiques constitue un frein au remboursement de ces tests par la sécurité sociale et à l'incorporation de ces tests dans la pratique de soins courants. Dans le cas de la TPMT, malgré certaines controverses notamment à cause de la très faible fréquence des individus ayant un déficit complet d'activité (~ 0,3 %) et parce que les patients porteurs d'un génotype sauvage peuvent aussi développer une

myélotoxicité, la plupart des études pharmaco-économiques sont en faveur d'un dépistage prospectif du déficit en TPMT [VAN DEN AKKER-VAN MARLE *et al.* 2006; MARRA *et al.* 2002; OH *et al.* 2004; THOMPSON *et al.* 2014]. Ainsi, une étude européenne a analysé le gain économique d'un génotypage de la TPMT pour la prévention de la myélosuppression chez les enfants ayant une LAL et traités par la 6-MP. Les auteurs ont calculé un bénéfice moyen de 2100 € par année de vie, établi en tenant compte du coût du génotypage – estimé à 150 € –, d'une estimation de la fréquence du déficit en TPMT, du taux de myélosuppression aux thiopurines chez les patients déficitaires pour la TPMT et du coût de prise en charge d'une hospitalisation pour myélosuppression parmi quatre pays européens (Allemagne, Irlande, Pays-Bas et Royaume-Uni) [VAN DEN AKKER-VAN MARLE *et al.* 2006]. Une étude pharmaco-économique similaire effectuée au Royaume-Uni chez des patients ayant une MICI a montré un bénéfice plus faible, d'environ 526 €, paradoxalement sans bénéfice estimé sur la qualité de vie [THOMPSON *et al.* 2014]. *A contrario*, une autre étude chez des enfants atteints de LAL a rapporté un coût supplémentaire de 277 \$ par enfant lors d'une adaptation des doses de 6-MP en fonction du génotype TPMT, par rapport à un protocole habituel avec une posologie en fonction du poids [DONNAN *et al.* 2011]. Cependant, cette dépense est minime par rapport au coût de prise en charge d'une LAL. De plus, il est fort probable que le bénéfice économique d'un génotypage TPMT avant traitement par thiopurine, même s'il est négatif comme dans le cas de l'étude de Donnan *et al.*, augmente au fil du temps parallèlement à la forte décroissance des coûts de génotypage. Ce bénéfice sera d'autant plus important dans des cas tels que celui du gène *TPMT*, dont la présence homozygote de variants alléliques est rare, nécessitant de dépister de nombreux patients (entre 150 et 300 patients) pour détecter un patient à risque sévère de myélosuppression. Les progrès actuels de la génomique vont permettre d'effectuer des génotypages en haut-débit ou même un séquençage d'exon pour des coûts dérisoires.

Au-delà des questionnements économiques se posent des problèmes éthiques. De nombreux tests pharmacogénétiques, tels que la TPMT ou encore la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPYD) dans les traitements par 5-fluorouracile (5-FU), ont une VPP élevée. Ainsi, en présence d'un déficit complet en TPMT, chez les patients porteurs de deux variants alléliques, une myélosuppression est observée chez quasiment tous les patients lors d'un traitement par thiopurine à dose standard. Il devient alors difficilement acceptable d'exposer des patients à un traitement par thiopurine, dont au minimum 1 à 2

patients sur 300 auront très probablement une myélosuppression potentiellement létale, alors qu'un test de dépistage simple et efficace est disponible. Bien entendu, le dépistage du déficit en TPMT ne se substitue pas à la numération sanguine régulière et réduit uniquement ce risque individuel étant donné que les déficits en TPMT n'expliquent d'environ un quart des myélosuppressions sous thiopurines. D'autres gènes restent encore à identifier pour prévenir un plus grand nombre d'accidents hématologiques aux conséquences graves. Dans le cas des thiopurines, une des possibilités pour s'affranchir du dépistage du déficit en TPMT est de débiter le traitement par une dose diminuée de moitié durant les 3 premiers mois et de surveiller la numération sanguine ou l'évolution des concentrations intra-érythrocytaires en 6-TGN. Cette stratégie, protégeant les patients porteurs d'un génotype *TPMT* hétérozygote d'un risque modéré de toxicité hématologique, expose tout de même les patients ayant un déficit TPMT complet à un risque de myélosuppression, à moins de réduire drastiquement les doses de 90 %, selon les recommandations de Relling *et al.* De plus, cela entraîne un important retard d'efficacité thérapeutique pour les patients, notamment dans les MICI où l'azathioprine constitue le traitement de référence du maintien de la rémission.

Enfin, concernant l'accessibilité aux tests pharmacogénétiques, tous les patients sur le territoire national devraient avoir la même égalité de prise en charge, sans perte de chance en fonction de leur localisation. Dans le domaine de cancérologie, pour pallier à certains manques, le troisième Plan Cancer (2014-2019) a ainsi parmi ses objectifs de « permettre un accès large au diagnostic individualisé dans toute la France », et d'inclure le développement de la pharmacogénétique dans des plateformes de génétique moléculaire, dont le maillage territorial devra être dense pour couvrir l'ensemble de la population [INCA 2014].

#### ➤ *Approches pharmacogénétiques intégrées*

Des recommandations thérapeutiques de pharmacogénétique, fondées sur des approches monogéniques, ont été établies aux Etats-Unis par CIPC [CAUDLE *et al.* 2014]. Depuis 2011, 27 médicaments ont ainsi fait l'objet de *guidelines* d'adaptation posologique en fonction d'un génotype, publiés dans la revue *Clinical Pharmacology & Therapeutics* ([www.pharmgkb.org/page/cpic](http://www.pharmgkb.org/page/cpic)). En France, ces recommandations thérapeutiques pourraient être proposées par le Réseau national de Pharmacogénétique ou la Société



française de Pharmacologie et de Thérapeutique afin de guider les cliniciens dans l'utilisation de ces tests pharmacogénétiques.

Des algorithmes thérapeutiques intégrés, établis à partir de facteurs pharmacogénétiques mais également physiopathologiques et thérapeutiques semblent plus intéressants pour individualiser la posologie d'un traitement. A titre d'exemple, le site [www.warfarindosing.org](http://www.warfarindosing.org) développé par la Washington University (MO, USA) propose une posologie de warfarine en fonction des génotypes de plusieurs gènes (*VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* et *CYP2C9*) mais également de facteurs démographiques (âge, sexe, ethnicité) cliniques (taille, poids, indication de la warfarine), biologiques (INR), environnementaux (tabac) et thérapeutiques (prise de statine, d'amiodarone, de dérivés azolés ou de cotrimoxazole). En France, les travaux du laboratoire d'oncopharmacologie de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (Université d'Angers) ont abouti à la création d'une société, Onco Drug Personalized Medicine, qui commercialise un outil de prévention des toxicités au 5-FU prenant en compte simultanément le génotype *DPYD* et des paramètres physiopathologiques, permettant d'avoir une sensibilité et une spécificité annoncées, respectivement, de 98 % et de 99,5 % ([www.odpm.fr](http://www.odpm.fr)). Cette société propose également une aide à la décision de la posologie de 5-FU à administrer en fonction des résultats du STP et de paramètres physiopathologiques. Ce type d'outil n'existe pas encore pour la prescription des thiopurines et pourrait être utile afin de rationaliser l'utilisation du STP et des données pharmacogénétiques de la TPMT, voire d'autres gènes.

➤ *De la place pour d'autres marqueurs pharmacogénétiques ?*

La TPMT, enzyme présentant une très grande variabilité au sein du métabolisme des thiopurines, est le facteur pharmacogénétique autour duquel s'est développée l'optimisation thérapeutique des thiopurines en pratique de soins courants. Cependant, la détermination d'un génotype *TPMT* sauvage n'exclut pas l'apparition d'effets indésirables, le déficit en TPMT n'expliquant qu'un quart des toxicités hématologiques [COLOMBEL *et al.* 2000; DEWIT *et al.* 2011]. D'autres gènes du métabolisme des thiopurines ont potentiellement un intérêt pour l'optimisation thérapeutique. L'ITPA, est une enzyme prévenant l'accumulation toxique d'un dérivé thiopurinique, le 6-TITP, et dont la détermination de l'activité et/ou du génotype est intégrée dans les soins courants dans certains centres hospitaliers. L'identification d'un déficit en ITPA est un facteur de



prédisposition à la survenue d'effets indésirables, plutôt de type immuno-allergiques [MARINAKI *et al.* 2004]. Par ailleurs, l'HPRT, première enzyme de la voie de la synthèse *de novo* des purines et présentant une Km 17 fois plus faible pour la 6-MP que la TPMT, possède une activité relativement conservée dans la population générale [BLAKER *et al.* 2013; LENNARD *et al.* 1993]. De faibles variations d'activité sont susceptibles d'entraîner une modulation importante de la production des 6-TGN. Une étude prospective a d'ailleurs rapporté une corrélation positive entre l'activité HPRT et la survenue de leucopénies [DING *et al.* 2012]. Ainsi, l'incorporation dans la prise en charge thérapeutique d'autres gènes du métabolisme ou transport des thiopurines – tels que *HPRT*, *ITPA*, *XO*, *MTHFR*, *ABCC4* – est prometteuse pour la prédiction de la réponse clinique. Ces facteurs pharmacogénétiques, utilisés seuls ou combinés entre eux, devront être incorporés dans des algorithmes d'optimisation thérapeutique restant à définir.

## 2 Nouvelles approches pour de prédiction de la réponse aux médicaments

Historiquement, la pharmacogénétique s'est développée de façon monogénique – un médicament pour un gène – grâce à des techniques « classiques » de biologie moléculaire. Ainsi, alors qu'il y a eu au cours des 20 dernières années des progrès significatifs en recherche pharmacogénétique, l'intégration clinique de la pharmacogénétique est restée limitée à un faible nombre de médicaments (cf. Annexe 1). Il paraît vraisemblable qu'une meilleure prédiction de la réponse aux médicaments sera possible avec des approches pharmacogénomiques globales. Ces marqueurs pharmacogénomiques ne seront pas forcément en lien avec le métabolisme des médicaments, comme le sont actuellement la plupart des tests pharmacogénétiques. De nouvelles approches *in vitro* ou cliniques sont à développer pour permettre la découverte de ces marqueurs avec des méthodes de recherche sans *a priori*.

➤ *Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes, un outil pharmacogénomique in vitro prometteur ?*

Les LCL provenant d'individus sains constituent un modèle novateur en pharmacogénomique pour l'exploration de voies métaboliques associées à la réponse aux médicaments. Elles sont particulièrement adaptées aux études transcriptomiques ou aux études d'association sur génome entier (GWAS). Ces lignées cellulaires, utilisées dans de nombreux projets en génomique tel que le projet HapMap, permettent de générer des hypothèses de recherche dans le but d'identifier des facteurs génomiques prédictifs de la réponse aux médicaments [INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM 2003]. A titre d'exemple, ce modèle a permis la découverte de l'implication du gène *CHL1*, prédisant la réponse aux inhibiteurs de la recapture de la sérotonine dans le domaine de la dépression, ultérieurement retrouvé dans une très large étude GWAS comme associé à la présence d'effets indésirables aux antidépresseurs chez des patients souffrants de dépression [CLARK *et al.* 2012; MORAG *et al.* 2011].

Ce modèle a été mis en place au laboratoire afin d'identifier de nouveaux facteurs génétiques prédictifs de la résistance aux thiopurines.

Après avoir analysé la variabilité des principales enzymes du métabolisme des thiopurines dans ce modèle, une analyse transcriptomique globale a été effectuée sur des lignées préalablement sélectionnées pour leur phénotype extrême « résistant » ou à l'inverse, « sensible », aux thiopurines. Nous avons ainsi pu établir une signature transcriptomique comprenant 32 gènes, prédictive de la résistance aux thiopurines, dont certains gènes tels que *TNFRSF10D*, cible de p53 et membre de la super-famille des récepteurs au TNF, ont déjà été associés à des cas de résistance aux chimiothérapies [LIU *et al.* 2005]. Cette signature moléculaire incluait également le gène *GTPBP4*, codant pour une protéine nucléolaire liant le GTP et interagissant avec p53, et dont la diminution de l'expression dans les lignées résistantes pourrait être associée à une activation de p53 [LUNARDI *et al.* 2010]. En effet, une analyse bioinformatique fonctionnelle des voies métaboliques associées à ce phénotype de résistance a mis en évidence une surexpression de la voie ATM/p53/p21. L'activation de cette voie, en présence de dommages à l'ADN, comme ceux induits par les 6-TGN, aboutit à l'inhibition des cyclines et a pour conséquence un arrêt ou un ralentissement du cycle cellulaire [CHEN *et al.* 2014; KOSTER *et al.* 2010]. Dans les lignées résistantes, ces gènes et voies métaboliques mis en évidence

par ce modèle sont en lien avec une activation de la voie p53, gène « suppresseur de tumeurs » dans les lignées résistantes.

Par ailleurs, dans ces même lignées, nous avons mis en évidence une sous-expression d'*ARHGDI*A, faisant parti du cycle des RhoGTPases [ETIENNE-MANNEVILLE & HALL 2002]. Sa proximité fonctionnelle avec Rac1, cible moléculaire des thiopurines, constitue une piste de recherche originale et prometteuse pour l'identification de facteurs génétiques impliqués dans la résistance aux thiopurines.

Nous avons ainsi mis en lumière des voies moléculaires pouvant être à l'origine d'une réduction de l'apoptose dans les lymphocytes, associée à une résistance au traitement. Ces facteurs pharmacogénomiques identifiés à l'aide des LCL nécessitent une validation fonctionnelle *in vitro*, par exemple à l'aide d'ARN interférence pour analyser les conséquences phénotypiques de l'invalidation de ces gènes.

- *Approches « big-data » en pharmacogénomique : intérêts des entrepôts de données cliniques couplés à une biobanque*
- Médecine factuelle en pharmacogénomique

Les preuves en médecine factuelle (*evidence-based medicine*) sont fondées sur des essais cliniques prospectifs, contrôlés et randomisés (*randomized controled trials*, RCT) qui font référence pour la démonstration aussi bien de l'efficacité d'un médicament que pour l'évaluation d'une pratique de soins. Ces essais, portant sur une population bien définie, sont généralement difficiles à mettre en œuvre et très coûteux. Ils excluent quasi-systématiquement certains sous-groupes de patients, pourtant d'intérêt majeur pour l'optimisation thérapeutique, tels que les patients âgés, ayant des comorbidités ou encore polymédicamentés [BOWTON *et al.* 2014]. Concernant la pharmacogénétique, ces RCT ne sont particulièrement pas adaptés pour au moins trois raisons : (i) les variations génétiques, principalement des SNP, même si elles ne sont pas « rares » (< 1 %) au sens génétique du terme, ont rarement une fréquence supérieure à quelques pourcents en population générale ; (ii) les recherches pharmacogénétiques peuvent concerner des médicaments mis le marché depuis de nombreuses années, dont le brevet peut être dans le domaine public (ex : thiopurines, fluoropyrimidines) et pour lesquels aucune industrie pharmaceutique ne sera promoteur d'un RCT ; (iii) les critères d'évaluation choisis,

cliniques ou biologiques, ne sont pas toujours pertinents pour conclure quant à l'intérêt du test génétique dans le cadre d'essais cliniques où les différences entre les groupes génotypés et non génotypés peuvent être faibles du fait du suivi très strict des patients inclus dans l'étude. Par ailleurs, les études longitudinales observationnelles portant sur des grandes cohortes de patients suivis de nombreuses années nécessitent des investissements importants de temps et d'argent. Des analyses en sous-groupes, telles que la comparaison de plusieurs génotypes, sont complexes à mettre en place si elles n'étaient pas prévues dans le protocole initial, et les résultats cliniques sont limités aux pathologies définies lors de la conception de l'étude [BOWTON *et al.* 2014]. Cette méthodologie n'est donc pas totalement adaptée à la recherche clinique en génomique.

Ainsi, d'autres alternatives méthodologiques, nécessitant l'obtention de données génomiques globales, par génotypage sur puce ou par séquençage, sont à développer pour évaluer ou mettre en place des tests pharmacogénomiques. Ces données génomiques devront être associées à des données cliniques ou biologiques de manière à pouvoir multiplier les axes de recherche. Une voie prometteuse est celle de l'utilisation conjointe d'une biobanque et d'un CDW.

#### - Biobanques

De manière générale, il convient de distinguer deux types de biobanques : les biobanques en population générale permettant d'avoir des approches sans *a priori*, et les biobanques basées sur une pathologie ou une caractéristique physiopathologique particulière, dont les échantillons ont été obtenus au cours d'un protocole spécifique [NAM *et al.* 2011]. Ce second type de biobanque est largement utilisé en cancérologie à l'aide d'échantillons de tissus tumoraux obtenus par biopsie. A l'inverse, les biobanques en population générale contiennent, pour chaque patient, des échantillons de sérum, de plasma, d'ADN génomique, voire des LCL [NAM *et al.* 2011]. Ces biobanques sont constituées à partir de prélèvements de patients consécutifs, non sélectionnés et ayant donné leur consentement. Les biobanques en population générale sont ainsi un outil intéressant pour la recherche de biomarqueurs en génomique et plus particulièrement en pharmacogénomique [OLSON *et al.* 2014]. Un exemple intéressant est celui de l'hôpital de la Vanderbilt University à Nashville (TN) aux Etats-Unis qui a mis en place ce type de banque à ADN et dispose d'un recueil de consentement par non-opposition de principe

(*opt-out*) : tous les patients hospitalisés auront un prélèvement sanguin qui sera anonymisé en vue d'intégrer la biobanque, à l'exception de ceux qui refusent expressément [PULLEY *et al.* 2010].

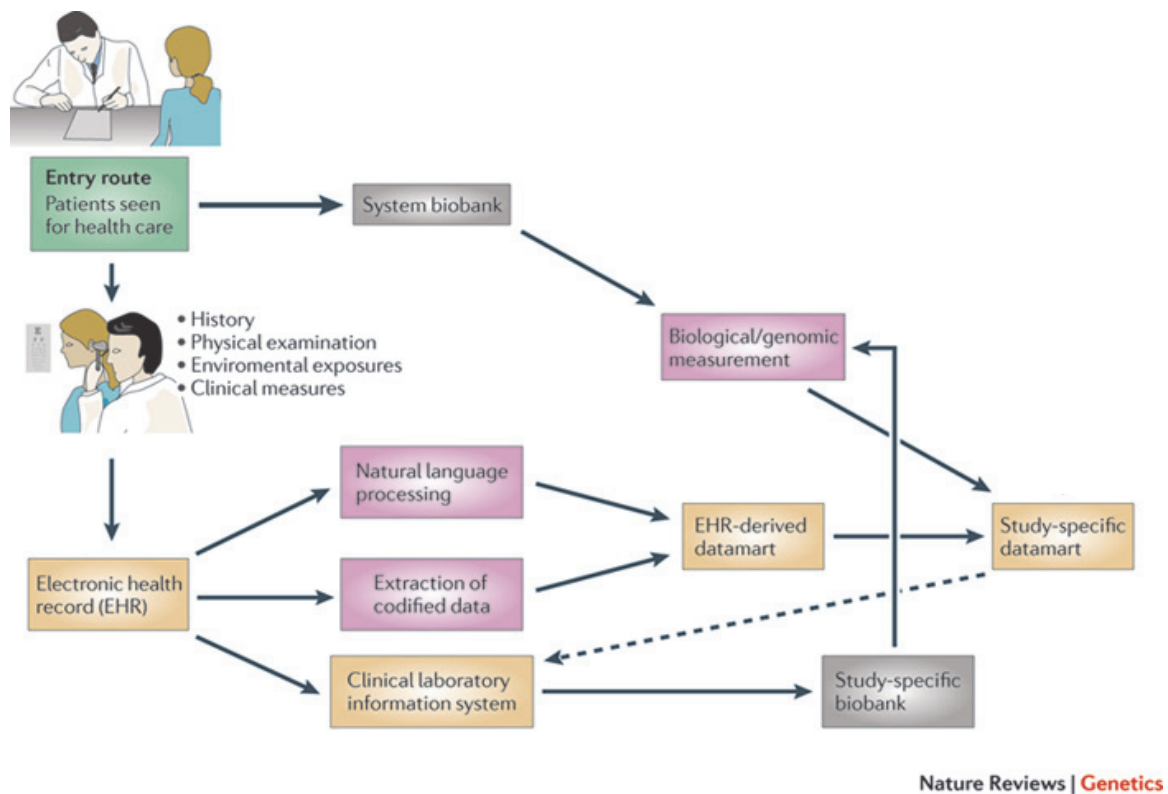
Dans le domaine des thiopurines, des approches génomiques globales ont permis la découverte de marqueurs génétiques intéressants. Ainsi, une étude GWAS chez des patients présentant des toxicités gastro-intestinales aux thiopurines a rapporté l'implication d'un gène, *PACSLN2*, codant pour une kinase pouvant avoir un rôle dans la modulation de l'activité TPMT, dont l'impact clinique est actuellement incertain [ROBERTS *et al.* 2014b; STOCCO *et al.* 2012]. Par ailleurs, très récemment, une étude GWAS dans une population coréenne a rapporté une très forte association entre la présence d'un SNP sur le gène *NUDT15* et la survenue de leucopénies précoces aux thiopurines [YANG *et al.* 2014]. Ce gène code pour une enzyme qui catalyserait, *in vitro*, l'hydrolyse des nucléotides diphosphate ou triphosphate et modifierait l'équilibre du pool de nucléotides thiopuriniques. Ces facteurs pharmacogénomiques nécessitent des validations ultérieures avant de pouvoir être transférés en pratique de soins courants.

- Couplage entrepôt de données cliniques - biobanque

Le couplage d'une banque d'ADN à un CDW, associé à de fortes capacités informatiques afin par exemple d'exploiter les données en texte libre – tels que dans les comptes rendus d'hospitalisation ou de consultation –, permet de puissantes corrélations entre génotypes et phénotypes de réponse à un médicament dans le cadre de la pharmacogénomique ou de la pharmacovigilance [PATHAK *et al.* 2013]. Plus largement, de nombreuses applications sont très prometteuses en génomique ou en « médecine de précision », établissant une définition au niveau moléculaire des phénotype cliniques et de processus pathologiques [NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON A FRAMEWORK FOR DEVELOPING A NEW TAXONOMY OF DISEASE 2011].

Cette approche a été mise en place aux Etats-Unis au sein du réseau eMERGE avec pour objectif le développement d'axes de recherche fondés sur des données existantes dans le but d'intégrer des informations génomiques en pratique de soins courants [MCCARTY *et al.* 2011]. Ce réseau eMERGE a permis diverses études d'association sur génome (GWAS) et phénotype (PheWAS) entiers incluant plusieurs milliers de patients [RITCHIE *et al.* 2013b; SHAMEER *et al.* 2014]. Cette méthodologie présente le double avantage de réutiliser des

données cliniques existantes provenant de la pratique de soins courants, et d'utiliser des échantillons issus d'une biobanque, et dont les résultats pourront être utilisés ultérieurement pour le soin en fonction des nouvelles découvertes (FIGURE 13).



Source : adapté de [KOHANE 2011]

**FIGURE 13. Méthodologie de mise en place d'étude pharmacogénomique basée sur un entrepôt de données cliniques couplé à une biobanque**

En France, certains hôpitaux, comme par exemple l'HEGP, commencent à développer des CDW à partir des EHR. Ainsi, nous avons effectué, à notre connaissance, la première étude PheWAS dans le domaine de la pharmacogénomique et réalisée à partir d'une variable quantitative catégorisée – l'activité TPMT. La méthodologie d'un PheWAS, développée en 2010 par Denny *et al.*, a été conçue par similarité à celle d'un GWAS – étude d'association

comparant le génome de patients présentant une pathologie ou un signe clinique particulier par rapport à un groupe contrôle – permettant de comparer le phénomène de patients porteurs d'un SNP à un groupe contrôle [DENNY *et al.* 2010]. La dizaine de PheWAS publiée dans la littérature concerne l'association entre un SNP et une caractéristique physiopathologique. Appliquée à la pharmacogénomique, cette étude nous a permis d'explorer, sans *a priori*, les conséquences d'une activité TPMT très élevée sur le phénomène de patients hospitalisés avec un historique d'une dizaine d'années.

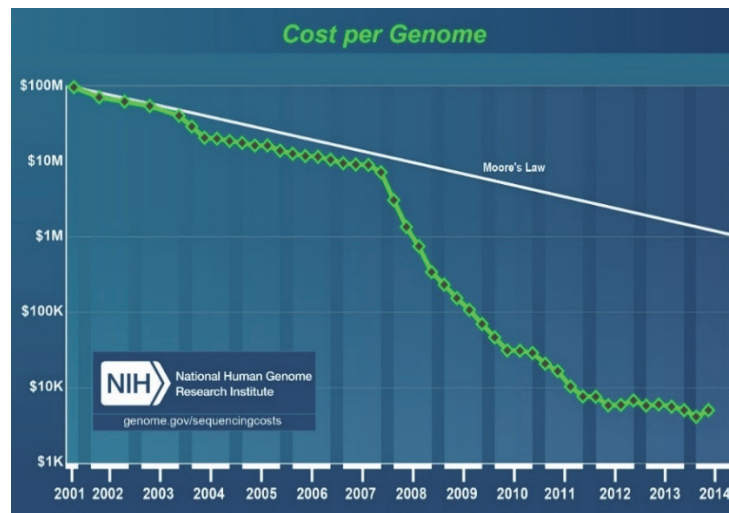
Un avantage important par rapport aux essais cliniques « classiques » est le faible coût de la réutilisation des données obtenues dans les EHR [DENNY 2012; BOWTON *et al.* 2014]. Les EHR contiennent un suivi longitudinal de données médicales fiables obtenues dans le cadre de la pratique de soins courants. Ces données représentent la « vraie vie » et peuvent être obtenues sans nécessiter d'importants moyens financiers, excepté la présence sur site d'une forte capacité bioinformatique (FIGURE 13). Un autre avantage des EHR, lorsqu'ils sont associés à une banque d'ADN, est la réutilisation potentielle d'informations génétiques provenant d'un autre domaine de recherche que celui pour lequel elles ont été produites [DENNY 2012]. Cela est particulièrement vrai pour les données génétiques denses telles que celles générées par les études sur génome entier (GWAS) ou par séquençage.

### 3 Conclusion générale : l'avènement de la pharmacogénomique ?

L'évolution rapide des techniques de biologie moléculaire et l'achèvement du séquençage du génome humain en 2003 ont fait émerger la génomique [GOLDSTEIN *et al.* 2003]. La convergence de la pharmacogénétique avec la génomique a permis le développement d'une approche plus large, la pharmacogénomique. L'identification de variations génétiques pouvant moduler la réponse aux médicaments sera possible grâce à des méthodes de séquençage couvrant le génome entier regroupées sous le terme de « *next-generation sequencing* » (NGS). Ainsi, l'approche monogénique qui prévalait pour la pharmacogénétique sera probablement complétée par des analyses plus globales ciblant de nombreux gènes– par exemple codant pour une succession d'enzymes impliquées dans le métabolisme d'un médicament [WEINSHILBOUM & WANG 2004]. Ainsi, la caractérisation simultanée de plusieurs gènes codant pour diverses protéines impliquées dans la pharmacocinétique et/ou la pharmacodynamie d'un médicament permettra une approche par voie métabolique. Cette approche, plus réaliste, rendra possible une évaluation de la contribution totale de l'hérédité sur les variations de la réponse à un médicament [RITCHIE 2012]. Il est possible alors d'imaginer une individualisation thérapeutique non plus en fonction d'un seul gène mais en fonction d'une combinaison multiple de génotypes dont l'influence relative sera déterminée par des analyses multivariées. Ces évolutions vont modifier de façon significative l'usage du génotypage d'un polymorphisme et seront rendues possibles grâce aux avancées révolutionnaires du séquençage, dont le coût ne cesse de diminuer.

Alors que le décryptage du génome humain qui s'est achevé en 2003 après presque une décennie a coûté 2,7 milliards de dollars, la décroissance des coûts du séquençage est exponentielle depuis 2008. Ainsi, selon le *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) aux Etats-Unis, le coût d'un séquençage du génome en avril 2014 est d'environ 4900 \$ ([www.genome.gov/sequencingcosts](http://www.genome.gov/sequencingcosts)) et il est estimé très prochainement à 1000 \$ [CHECK HAYDEN 2014].





Source : National Human Genome Research Institute (NHGRI) aux Etats-Unis

**FIGURE 14. Evolution des coûts du séquençage d'un génome humain**

Les études de validation permettant le transfert de nouveaux marqueurs pharmacogénomiques en pratique de soins courants devront être particulièrement adaptées à la pharmacogénomique. En effet, les multiples hypothèses testées (nombreux gènes, interactions gène-gène et gène-environnement) nécessiteront un très grand nombre de patients [RITCHIE 2012; WEINSHILBOUM & WANG 2004]. Pour faire face à cette difficulté, des innovations méthodologiques sont nécessaires pour la validation de marqueurs pharmacogénomiques. Les nouveaux outils de recherche et de validation pourraient inclure des études prédictives *in silico*, des banques d'ADN permettant d'utiliser un même échantillon pour plusieurs études, ou encore des CDW afin de mettre en place des études rétrospectives contrôlées sur de très grands effectifs avec un suivi longitudinal. Cependant, si les études *in silico* ne remplaceront probablement jamais les essais cliniques *in vivo*, elles permettront de présélectionner les études à mettre en œuvre afin d'augmenter leur chances de réussite.

Enfin, l'incorporation de nouveaux tests pharmacogénomiques en pratique de soins courants ne pourra se faire que sur la base de recommandations et d'algorithmes de prise en charge thérapeutique précis guidant le clinicien « non averti » dans sa prescription. A terme, ces recommandations seront intégrées dans les RCP des médicaments et apparaîtront dans des systèmes d'aide à la prise de décision lors de la prescription médicamenteuse informatisée.

# ANNEXES

---

## Annexe 1 – tests pharmacogénétiques

---

---

Médicament	Gène	« Anomalie génétique » dépitée	Risque clinique en présence de « l'anomalie génétique »	Type d'étude pharmacogénomique (GWAS, étude gène candidat, essai clinique)
Abacavir	HLA-B	HLA-B*5701	Réaction d'hypersensibilité	Essai clinique prospectif [MALLAL <i>et al.</i> 2008]
Aripiprazole	CYP2D6	Métaboliseur lent	Idées suicidaires Majoration des troubles dépressifs	N/A [SWEN <i>et al.</i> 2011]
Azathioprine 6-mercaptopurine 6-thioguanine	TPMT	TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3C	Aplasie médullaire	Etudes gène candidat [LENNARD <i>et al.</i> 1989, 1990; RELLING <i>et al.</i> 1999]
Carbamazépine	HLA-B	HLA-B*1502	Syndrome de Stevens-Johnson Syndrome de Lyell (nécrolyse épidermique toxique)	Etude gène candidat [CHUNG <i>et al.</i> 2004]
Clopidogrel	CYP2C19	CYP2C19*2 et CYP2C19*3	Effet thérapeutique (inhibition de l'agrégation des plaquettes) réduit et risque cardiovasculaire augmenté	Etude gène candidat et GWAS [MEGA <i>et al.</i> 2009; SHULDINER <i>et al.</i> 2009]
Irinotecan	UGT1A1	UGT1A1*28	Risque de neutropénie majorée	Etude gène candidat [IYER <i>et al.</i> 2002]
Ivacaftor	CFTR	Mutation G551D	Efficacité (absence d'efficacité en présence de la mutation F508del)	Essai clinique prospectif [RAMSEY <i>et al.</i> 2011]
Tetrabenazine	CYP2D6	Métaboliseur lent	Augmentation du risque de dépression et d'idées suicidaires Allongement du QT Troubles de la vigilance	N/A
Warfarine	CYP2C9 VKORC1	CYP2C9*2, CYP2C9*3 SNP -1639G>A VKORC1	Risque majoré de saignements	Etude gène candidat et GWAS [COOPER <i>et al.</i> 2008a; INTERNATIONAL WARFARIN PHARMACOGENETICS CONSORTIUM <i>et al.</i> 2009; RIEDER <i>et al.</i> 2005]

Source : adapté de [GIACOMINI *et al.* 2012]

Cette liste non exhaustive est constituée des médicaments qui ont des informations de pharmacogénétiques dans le RCP de la FDA (recommandations ou précaution d'usage).  
Liste complète disponible sur le site de la FDA ([www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm](http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm)).  
Les types d'études (GWAS, étude gène-candidat ou essai clinique prospectif)

## Annexe 1. Exemples de tests pharmacogénétiques inclus dans les résumés des caractéristiques du produit de la FDA

## Annexe 2 – lettre à l'Editeur dans *J Crohns Colitis*

---

### **Lettre à l'Editeur publiée dans *Journal of Crohn's and Colitis***

En réponse à la publication de Hindorf & Appell dans *Journal of Crohn's and Colitis* comparant l'efficacité du phénotypage et du génotypage de la TPMT pour l'identification des patients à risque de développer une myélosuppression sous thiopurines [HINDORF & APPELL 2012].

« TPMT status determination: the simplest is the most effective? »

Chouchana L, Narjoz C, Lorient MA. *J Crohns Colitis*. 2012;6(7):807.

*Impact factor : 3,4*

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect



## LETTER TO THE EDITOR

## TPMT status determination: The simplest is the most effective?

Dear Sir,

We carefully read the article by Hindorf and Appell stating that genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase (TPMT) function.<sup>1</sup> As evidence since many years, TPMT status should be determined before a thiopurine treatment to identify patients at risk for severe adverse events, as bone marrow suppression, and to propose an individualized dosage.<sup>2</sup> Hindorf and Appell mentioned "it is not reasonable to check both genotype and phenotype in all patients". We agree with that statement but we are concerned by the conclusions drawn by the authors and the choice for genotyping as primary choice.<sup>1</sup>

TPMT genotype is almost exclusively determined on the basis of testing the three mutations 238 G>C, 460 G>A and 719 A>G, defining the most frequent defective TPMT alleles (\*2, \*3A and \*3C), and covering more than 90% of the mutations in the Caucasian population.<sup>3</sup> Indeed, as the authors mentioned, assessing only genotype before treatment leads to not detect 8% and 1% of the homozygous and heterozygous mutant patients who are, respectively, at highly and elevated risk of hematological accidents. These patients, at least the homozygous deficient, will develop a potentially lethal hematological adverse event when treated with standard dose of thiopurine while their physician thought to have excluded that risk by a TPMT genotyping.<sup>4</sup>

Recently, we analyzed the correlation between TPMT phenotype and genotype in 1500 IBD patients from our university hospital.<sup>5</sup> Negative predictive value for genotyping to predict a low or intermediate phenotype was 95.3%, meaning that around 5% of the patients with a complete or partial TPMT deficiency will slip through the net. In this situation, we think that phenotype is more powerful to detect patients at risk of hematological adverse event.<sup>5</sup> In case of deficient TPMT activity, TPMT genotype could be checked to confirm the genetically based low enzyme activity and to exclude technical or pre-analytical problems. Moreover, phenotyping allows to identify patients with very high TPMT activity, usually associated to 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) levels under therapeutic threshold, which are prone to exhibit thiopurine resistance.<sup>4</sup>

Although genotyping is probably the simplest method to identify TPMT deficient patients, phenotyping is more predictive for TPMT activity as it considers genotype, pathophysiological status and environmental factors (e.g. co-prescribed drugs, epigenetic regulation) that can also impact enzyme activity. However, standardization of its determination is challenging, requiring a probable redefinition and refinement of the cut-off values between low, intermediate and rapid TPMT metabolizers.

## Conflict of interest

None.

## References

1. Hindorf U, Appell ML. Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J Crohns Colitis* Dec 13 2011 [Epub ahead of print].
2. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;**89**:387–91.
3. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997;**126**:608–14 [70].
4. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;**336**:225–9.
5. Chouchana L, Roche D, Narjoz C, Pineau B, Chatellier G, Beaune PH, et al. *Gastroenterology* 2011;**140**:S281–2.

Laurent Chouchana  
Celine Narjoz  
Marie-Anne Lorient\*

Hôpital Européen Georges Pompidou,  
Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire  
Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité  
INSERM UMR-S775, Paris, France

\*Corresponding author.

E-mail address: [marie-anne.lorient@egp.aphp.fr](mailto:marie-anne.lorient@egp.aphp.fr)  
(M.-A. Lorient).

4 April 2012

## Annexe 3 – revue de la littérature dans *Aliment Pharmacol Ther*

---

Revue de la littérature sur les thiopurines publiée dans *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, suivie d'une correspondance de deux lettres à l'Editeur et de nos réponses.

« Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease »

Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(8):967-9.

*Impact factor : 4,5*

« Letter: thiopurine blood monitoring for patients with inflammatory bowel disease – authors' reply ». *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):742-3.

« Letter: TPMT activity and age in IBD patients – authors' reply ». *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):742-3.

# Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease

L. Chouchana<sup>\*,†,‡</sup>, C. Narjoz<sup>\*,†,‡</sup>, P. Beaune<sup>\*,†,‡</sup>, M.-A. Lorient<sup>\*,†,‡</sup> & X. Roblin<sup>§</sup>

\*Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochimie,

Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, Paris, France.

<sup>†</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

<sup>‡</sup>INSERM UMR-S775, Paris, France.

<sup>§</sup>CHU Saint-Etienne, Gastroentérologie, Saint-Etienne, France.

## Correspondence to:

Dr M.-A. Lorient, Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochimie, Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, 20 rue Leblanc, Paris, France.  
E-mail: marie-anne.lorient@egp.aphp.fr

## Publication data

Submitted 12 January 2011  
First decision 16 February 2011  
Resubmitted 6 October 2011  
Accepted 8 October 2011  
EV Pub Online 2 November 2011

*This uncommissioned review article was subject to full peer-review.*

## SUMMARY

### Background

Thiopurines represent an effective and widely prescribed therapy in inflammatory bowel disease (IBD). Concerns about toxicity, mainly resulting from a wide inter-individual variability in thiopurine metabolism, restrict their use. Optimal thiopurine dosing is challenging for preventing adverse drug reactions and improving clinical response.

### Aim

To review efficacy and toxicity of thiopurines in IBD. To provide pharmacogenetic-based therapeutic recommendations.

### Methods

We conducted a query on PubMed database using 'inflammatory bowel disease', 'thiopurine', 'azathioprine', '6-mercaptopurine', 'TPMT', 'pharmacogenetics', 'TDM', and selected relevant articles, especially clinical studies.

### Results

Thiopurine metabolism – key enzyme: thiopurine S-methyltransferase (TPMT) – modulates clinical response, as it results in production of the pharmacologically active and toxic metabolites, the thioguanine nucleotides (6-TGN). Adjusting dosage according to TPMT status and/or metabolite blood levels is recommended for optimising thiopurine therapy (e.g. improving response rate up to 30% or decreasing haematological adverse events of 25%). Other enzymes or transporters of interest, as inosine triphosphatase (ITPase), glutathione S-transferase (GST), xanthine oxidase (XO), aldehyde oxidase (AOX), methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and ATP-binding cassette sub-family C member 4 (ABCC4) are reviewed and discussed for clinical relevance.

### Conclusions

Based on the literature data, we provide a therapeutic algorithm for thiopurines therapy with starting dose recommendations depending on TPMT status and thereafter dose adjustments according to five metabolite profiles identified with therapeutic drug monitoring (TDM). This algorithm allows a dosage individualisation to optimise the management of patients under thiopurine. Furthermore, identification of new pharmacogenetic biomarkers is promising for ensuring maximal therapeutic response to thiopurines with a minimisation of the risk for adverse events.

*Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 15–36



## INTRODUCTION

Thiopurine drugs, discovered by Elion and Hitching in the middle of the last century, are mainly represented by mercaptopurine (6-MP), its pro-drug azathioprine (AZA), and 6-thioguanine (6-TG).<sup>1</sup> These drugs have cytotoxic and immunosuppressive properties. 6-MP and AZA are major drugs in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis. The earliest use in IBD was reported in 1962 by Bean for the treatment of ulcerative colitis.<sup>2</sup> Currently, about half of IBD patients have received thiopurines.<sup>3, 4</sup> They are frequently prescribed for patients in whom first-line therapy fails, in particular those who are steroid-dependent or who do not have a response to systematic corticosteroids.<sup>5, 6</sup> Both AZA and 6-MP have proven their efficacy for the induction of remission in active Crohn's disease,<sup>7, 8</sup> for maintaining remission and sparing steroids in quiescent steroid-dependent Crohn's disease,<sup>9, 10</sup> or for preventing recurrence after surgery in Crohn's disease.<sup>11-15</sup> For use in ulcerative colitis, efficacy has been proven for maintenance therapy, but only as alternative treatment.<sup>16</sup>

Besides having good clinical efficacy, thiopurines demonstrate wide inter-individual variability in terms of response. Indeed, between 15% and 28% of patients experience adverse drug reactions (haematologic, hepatic, pancreatic).<sup>17-19</sup> Moreover, about 9% of IBD patients are classified as resistant to thiopurines, i.e. there is no therapeutic effect.<sup>20</sup> This inter-individual variability mainly results from thiopurine metabolism. Hence, understanding thiopurine metabolism is a key for preventing adverse events and optimising therapy.

In the first part of this review, thiopurine metabolism and some pharmacogenetics evidence are presented. Then, thiopurine response in IBD – efficacy and toxicity – will be described, followed by a pathophysiological discussion and identification of certain risk factors, with the contribution of pharmacogenetics to each item, for optimising thiopurine therapy. Thereafter, some new pharmacogenetic targets of interest will be highlighted. Finally, some therapeutic recommendations will be provided.

## THIOPURINE METABOLISM

### Pharmacokinetics – pharmacodynamics

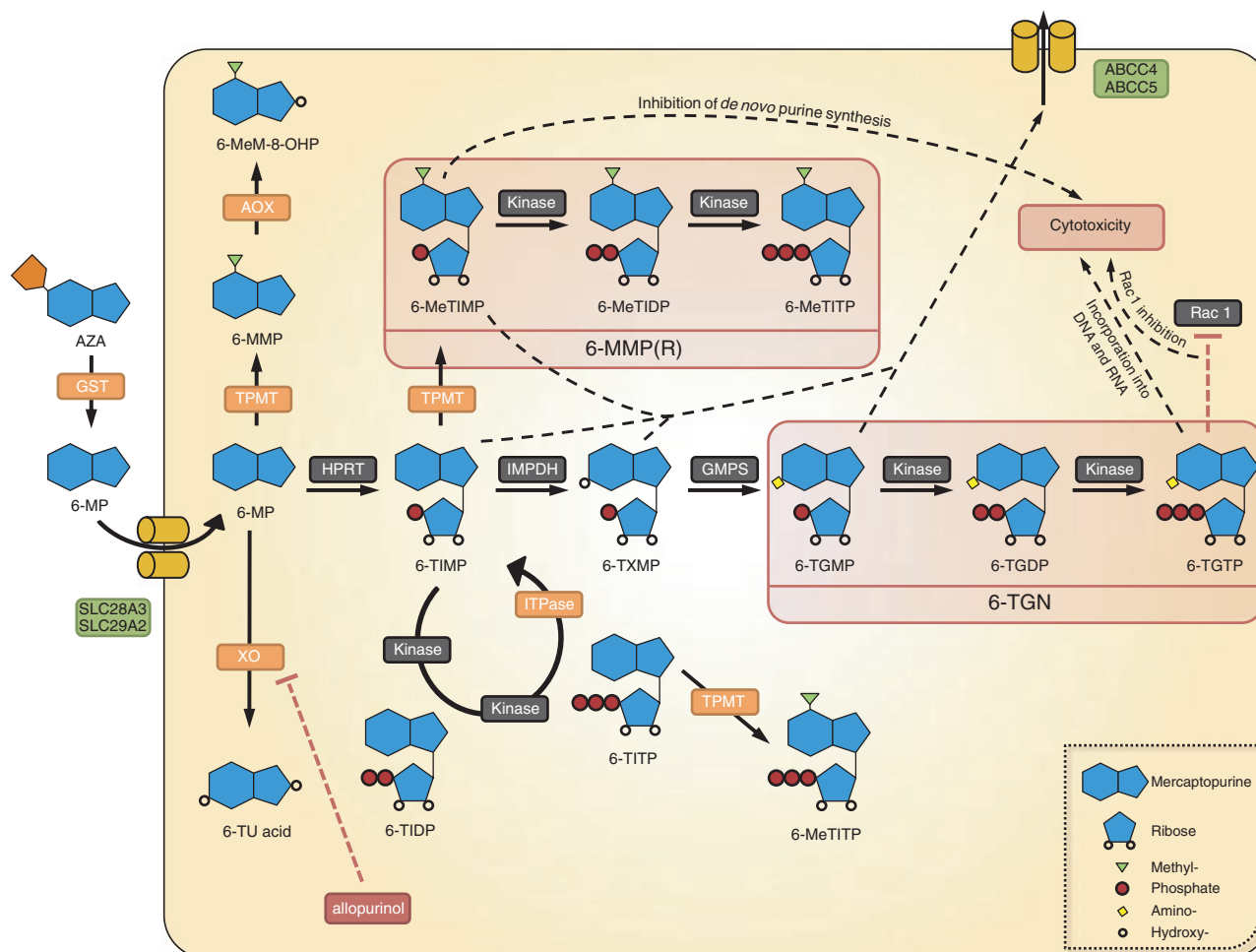
Neither AZA nor 6-MP has intrinsic activity; hence they have to undergo extensive metabolic transformations to exert their clinical efficacy.<sup>21</sup> After successive biotransformations, thiopurines lead to purine analogues that have cytotoxic effects and are incorporated into DNA (Figure 1).

Once absorbed, AZA is rapidly and largely transformed to 6-MP, probably by glutathione S-transferase (GST).<sup>22, 23</sup> Following intra-cellular uptake by nucleoside transporters (SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1 and SLC29A2)<sup>24-26</sup> 6-MP is then metabolised according to three competitive enzymatic pathways: two of which are catabolic, xanthine oxidase (XO) and thiopurine S-methyltransferase (TPMT), and one is anabolic, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). XO leads to thiouric acid, an inactive metabolite excreted in urine and TPMT methylates 6-MP into 6-methylmercaptopurine (6-MMP). Activation pathway, through HPRT, followed by inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and guanosine monophosphate synthase (GMPS) conversion, results, after successive kinase, in 6-thioguanine monophosphate (6-TGMP), diphosphate (6-TGDP) and triphosphate (6-TGTP), i.e. the 6-thioguanine nucleotides (6-TGN), which represent active metabolites (Figure 1).<sup>21, 27, 28</sup> While thiopurines are inactive molecules with a half-life of about 1–2 h, therapeutic response is related to 6-TGN production and accumulation.<sup>29</sup> *In vivo*, 6-TGN steady-state is approximately achieved in 4–5 weeks and their half-life is between 3 days and 13 days, with wide inter-individual variations.<sup>30-33</sup> Thus, for most patients, efficacy is achieved between 12 weeks and 17 weeks after treatment initiation.<sup>8</sup>

Intracellular 6-TGN are incorporated into DNA instead of guanine nucleotides, which, after a strand breakage, triggers cell-cycle arrest and apoptosis.<sup>34</sup> This results in the inhibition of nucleotide and protein synthesis, and ultimately in the inhibition of lymphocytes proliferation.<sup>35</sup> In addition, one 6-TGN in particular, specifically 6-TGTP, binds to Rac1 and inactivates it by modulation of the Vav-Rac1 signalling pathway in T lymphocytes.<sup>36, 37</sup> Therefore, it suppresses the activation of Rac1 target genes, such as NF- $\kappa$ B, and exerts a pro-apoptotic action on T-lymphocytes. This mechanism plays a major role in the therapeutic effect of thiopurines in IBD.<sup>38, 39</sup> As a result, the increasing apoptosis of activated T-lymphocytes, due to the accumulation of active metabolites, decreases inflammation.<sup>40</sup> In addition, a methylated product of TPMT, 6-methylthioinosine monophosphate (6-MeTIMP), being part of the 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMP(R)), is an inhibitor of purine *de novo* synthesis and seems to contribute, probably in a small manner, to the antiproliferative properties of the thiopurines.<sup>41-43</sup>

### Pharmacogenetics & thiopurine S-methyltransferase

Thiopurines are metabolised by a complex multistep enzymatic pathway. This metabolism, and therefore



**Figure 1 | Thiopurine metabolism.** (i) Drugs and metabolites. AZA, azathioprine; 6-MP, mercaptopurine; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; 6-TU acid, 6-thiouric acid; 6-MeTIMP, 6-methylthioinosine monophosphate; 6-MeTIDP, 6-methylthioinosine diphosphate; 6-MeTITP, 6-methylthioinosine triphosphate; 6-TIMP, 6-thioinosine monophosphate; 6-TIDP, 6-thioinosine diphosphate; 6-TITP, 6-thioinosine triphosphate; 6-TXMP, 6-thioxanthosine monophosphate; 6-TGMP, 6-thioguanine monophosphate; 6-TGDP, 6-thioguanine diphosphate; 6-TGTP, 6-thioguanine triphosphate; 6-MeM-8-OHP, 6-methylmercapto-8-hydroxypurine. 6-MeTIMP, 6-MeTIDP and 6-MeTITP together form the 6-methylmercaptopurine ribonucleotides, 6-MMP(R). 6-TGMP, 6-TGDP and 6-TGTP together form the 6-thioguanine nucleotides, 6-TGN. (ii) Enzymes. GST, glutathione S-transferase; AOX, aldehyde oxidase; XO, xanthine oxidase; TPMT, thiopurine S-methyltransferase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; ITPase, inosine triphosphatase. (iii) Transporters. SLC28A3 and SLC29A2: solute carrier family, formerly nucleoside transporter; ABCC4 and ABCC5: ATP-binding cassette, formerly multidrug resistance-associated protein. Adapted with permission from Informa Healthcare: Stocco *et al.*<sup>194</sup>

production of active metabolites, is mainly regulated by TPMT (EC 2.1.1.67). TPMT was first partially purified and characterised by Woodson and Weinshilboum in 1983.<sup>44, 45</sup> It is a cytosolic enzyme that catalyses the methylation of aromatic cycles, especially thiopurines, using S-adenosyl L-methionine (SAM), as a methyl provider.<sup>46, 47</sup> SAM is a mandatory co-factor, and lack of SAM could alter TPMT activity.

Thiopurine S-methyltransferase activity presents a wide inter-individual variability.<sup>48</sup> Historically, Weinshilboum and Sladek, in a study of 298 randomly selected patients, showed that TPMT activity has a trimodal distribution in the general population: approximately 89% have high enzyme activity, 11% intermediate activity and one over 300 (0.3%) a deficient activity.<sup>48</sup> Recently, a Spanish study on a large cohort of 14 545 patients with inflammatory

diseases reported a proportion of 0.5% of patients with deficient activity, which was confirmed in a cohort of healthy Caucasian subjects.<sup>49, 50</sup> However, even though a trimodal distribution is classically described, TPMT activity is rather variable across a large range of values. Indeed, among patients with high activity, about 15% have a TPMT activity above the normal value and 1–2% have an ultra-high TPMT activity (unpublished personal data).<sup>18</sup> The activity does not seem to be altered, in a relevant manner, by age or gender, even though some studies show a slightly lower activity in children and in females.<sup>50–52</sup>

Inter-individual variability of TPMT activity is partly caused by the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TPMT gene.<sup>53</sup> This gene, located on the short arm of the 6th chromosome (6p22.3), has approximately 34 kb in length and contains 10 exons and 9 introns.<sup>54</sup> To date, 30 variant alleles (TPMT\*2–TPMT\*28) have been characterised, and are associated with decreased enzyme activity, compared with the wild allele (TPMT\*1).<sup>55–58</sup> TPMT\*4 and TPMT\*15 involve intronic splice site sequences resulting in alternative TPMT mRNA splicing and decreased enzyme expression.<sup>59–61</sup> Other alleles are characterised by nonsynonymous SNPs.<sup>56</sup> These mutations cause a lowering of the protein amount in cells, which could be the result of an increased proteolysis rate by proteasome, and finally a decreased activity.<sup>54, 62, 63</sup> A correlation exists between TPMT phenotype and genotype: heterozygote patients for TPMT exhibit a partial deficit of enzymatic activity, while homozygote patients carrying two mutant alleles exhibit a full deficit of enzymatic activity.<sup>53, 64</sup> Different studies in Caucasians showed a similar distribution of TPMT variant alleles in healthy subjects and in IBD patients.<sup>65, 66</sup> In Caucasians, the most frequent mutant allele is TPMT\*3A (resulting from the frequent association of \*3B and \*3C alleles due to tight linkage disequilibrium) and four TPMT mutant alleles, namely TPMT\*2, \*3A, \*3B and \*3C, were detected in more than 80% of individuals with intermediate or poor metabolism.<sup>67–69</sup> However, substantial differences have been reported between ethnic groups. Mutation prevalence is approximately 10% in Caucasians, only 2% in South-West Asians and 5% in Chinese.<sup>70</sup> Regarding frequency distribution of variant alleles, even if TPMT\*3C is the most frequent variant in Chinese, African, Afro-American and South-East Asian populations, there is an important number of TPMT\*8 in Africans and TPMT\*6 in South-East Asians.<sup>69, 70</sup>

Previously described mutations affecting coding sequences of the TPMT gene are not sufficient to explain

the large variability of enzymatic activity observed in the general population. Indeed, discordances between genotype and phenotype, among individuals with deficient activity and wild-type genotype, have been reported in many populations.<sup>71, 72</sup> Other gene abnormalities, located on noncoding sequences of the TPMT gene and likely to alter the expression and/or the activity of TPMT, have been proposed.<sup>73</sup> The 5'-flanking region of the TPMT gene, with many transcription factor binding sites, has been studied, and a 'variable number tandem repeat'-like nucleotide sequence repetition has been identified.<sup>54</sup> It can result in shifts to lower or higher TPMT activities observed among discordant individuals.<sup>71</sup> Particularly, the presence of a trinucleotide repeat polymorphism within the TPMT gene promoter has been described in patients with ultra-high activity.<sup>74</sup> Nevertheless, the influence of these sequence repetitions on TPMT activity seems minor, compared with the importance of polymorphisms on the coding sequences, through which unidentified mutations could be involved.<sup>75, 76</sup> A recent meta-analysis showed a genotyping sensitivity to identify patients with low and intermediate TPMT activity from 70.33% to 86.15%.<sup>77</sup> Finally, in phenotype-genotype discordances, a particular attention should be drawn for patients who received packed red blood cells transfusion within the last 3 months: as TPMT is assayed on erythrocytes, phenotyping is not reliable during this time.<sup>64, 78, 79</sup>

Enzymatic activity and genetic polymorphisms of TPMT are partially involved in the variability of clinical response to thiopurines. Thus, individuals carrying a homozygous mutation associated with deficient TPMT activity are at greatly increased risk for potentially life-threatening haematological toxicity when exposed to standard doses of thiopurine drugs.<sup>80, 81</sup> Patients with a heterozygous mutation and intermediate TPMT activity could also be at increased risk of myelosuppression if the daily thiopurine dosage is not lowered.<sup>82</sup> Conversely, individuals with very high TPMT activity, correlated with low 6-TGN levels, may be underdosed with standard doses of these drugs.<sup>81</sup> This could explain, at least partially, resistance to thiopurines. In these patients, thiopurine daily dosage could be increased to achieve therapeutic 6-TGN blood levels. However, this strategy, poorly effective, requires a close clinical monitoring as it is at risk in most patients, because of a preferential 6-MMP(R) production upon dose escalation.<sup>20</sup> Finally, an inverse relationship between metabolite profile, i.e. 6-MMP(R)/6-TGN ratio, and therapeutic efficacy has been reported.<sup>20, 21, 31</sup> Another approach is to potentiate

6-TGN production with a managed drug-drug interaction possibly with a XO inhibitor, as allopurinol.<sup>83, 84</sup> Besides pharmacological resistance related to insufficient 6-TGN level, refractoriness to thiopurines can occur. In this situation, a thiopurine dose increase is ineffective and a switch to an alternative drug is required. Seidman concludes to thiopurine refractoriness if no clinical improvement has been observed after 4 months of AZA treatment at standard doses and if the ratio of 6-MMP(R)/6-TGN intra-erythrocyte level is over 30/1.<sup>85</sup> In this case, metabolites measurement can help to distinguish patient noncompliance with thiopurine therapy to refractoriness.

## THIOPURINE RESPONSE IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

### Efficacy

Because of their mechanism of action, thiopurines are slow acting drugs. A meta-analysis, including 367 patients with active Crohn's disease, showed a mean drug response period of approximately 17 weeks, ranging from 2 months to 12 months, due to 6-TGN accumulation.<sup>7</sup> The drug response rate increases with treatment duration.<sup>7</sup> The overall response rate for induction of remission, found in a meta-analysis of 425 patients from eight studies, was 54% vs. 33% for placebo (Table 1).<sup>8</sup> Recently, in a randomised double-blind trial by Colombel *et al.* (SONIC study), including 508 patients with moderate-to-severe active Crohn's disease, 30% of the 170 patients receiving AZA at 2.5 mg/kg/day had a corticosteroid-free clinical remission after 6 months.<sup>86</sup> A similar efficacy rate was found in a comparable study on 58 patients by Lemann *et al.*<sup>87</sup> However, a steroid sparing effect was observed in approximately 70% of 78 steroid-dependent patients with Crohn's disease receiving thiopurines for a year and a half.<sup>88</sup> Differences observed in clinical remission rates result from different assessment criteria (endpoints, time, population, various tools for disease activity assessment). Clinical remission should be evaluated with hard endpoints like the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) score below 150 at different time points and should include a corticosteroid sparing effect; additional endpoints may also consider mucosal healing as recently done in the SONIC trial.<sup>86, 89, 90</sup> Effectiveness of thiopurines is better for maintenance therapy, once remission is already induced. In a meta-analysis including 208 patients receiving AZA (1.0–2.5 mg/kg/day) for 6 months to 2 years, maintenance of remission with AZA was 71% vs. 55% for placebo.<sup>10</sup> Higher doses of

AZA (2.5 mg/kg/day) were more effective than lower doses (1.0 or 2.0 mg/kg/day) for preventing disease recurrence.<sup>10</sup> AZA has been evaluated in the maintenance of very long term remission, such as 64 months.<sup>91</sup> Its withdrawal induced a relapse rate between 14%<sup>91</sup> and 41%<sup>92</sup> for the first subsequent year, while the relapse rate on thiopurine maintenance therapy appeared to be approximately 5% per year.<sup>92, 93</sup> In a recent retrospective analysis of 363 IBD patients, approximately 50% of them were still using thiopurines after 24 months, the rate decreasing to 40% after 60 months.<sup>94</sup> This rate is generally the same whether patients have Crohn's disease or ulcerative colitis.<sup>94</sup> Thiopurines have also proven their efficacy for preventing clinical post-operative relapse in Crohn's disease. In two large prospective randomised clinical trials, relapse occurred between 0% and 17% after 12 months and 24 months, respectively, during AZA therapy (Table 1).<sup>95, 96</sup>

The clinical efficacy of thiopurines in IBD is related to the production of active metabolites. Cuffari *et al.* showed a significant negative correlation ( $P < 0.05$ ) between intra-erythrocyte 6-TGN levels and Crohn's disease activity in 25 adolescents.<sup>97</sup> A threshold 6-TGN level of 235 pmol/ $8 \times 10^8$  red blood cells (RBC), above which there is a significantly greater therapeutic response ( $P < 0.001$ ), has been found by Dubinsky *et al.* in a prospective study of paediatric IBD patients.<sup>98</sup> Since then, several prospective studies have reported a correlation between 6-TGN and clinical response,<sup>99–101</sup> and the 6-TGN cut-off efficacy value is probably 235–250 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC (Table 2).<sup>20, 97–99, 101</sup> Dubinsky *et al.* reported an odds ratio (OR) of 5.0 (95% CI, 2.6–9.7;  $P < 0.001$ ) for therapeutic response when the 6-TGN level is above 235 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC.<sup>98</sup> A 6-TGN level of 292 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC is associated with a positive predictive value of 85.7% for clinical response, according to a prospective study by Cuffari *et al.*<sup>102</sup> Similarly, a meta-analysis by Osterman *et al.* in 2006 concluded that patients with 6-TGN levels above 230–260 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC were more likely to be in remission (62%) than those below the threshold value (36%) (OR, 3.3; 95% CI, 1.71–6.27;  $P < 0.001$ ).<sup>103</sup> In contrast, more recently Reinshagen *et al.*, in a study of 58 IBD patients, reported a similar 6-TGN level of 222 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC at 16 weeks, both in patients with active disease and in remission.<sup>104</sup> However, in the largest prospective multi-centre study with 207 IBD patients, clinical response was significantly greater for patients with 6-TGN blood levels above 100 pmol/ $8 \times 10^8$  RBC (74% vs. 46%), and no overall relationship between mean 6-TGN levels and



Methodology of the study	Author, year	Indication	Number of treated patients	Response rate on thiopurine (%)	Duration of treatment	Drug	Comments
Prospective	Colombel, 2010 <sup>86</sup>	Steroid withdrawal	170	30	6.5 months	AZA	Moderate-to-severe patients
	Lemann, 2006 <sup>87</sup>	Steroid withdrawal	58	29	6 months	AZA/6-MP	
	O'Brien, 1991 <sup>88</sup>	Steroid withdrawal	52	70	1.6 year	AZA/6-MP	
	González-Lama, 2011 <sup>108</sup>	Steroid withdrawal	113	62	6 months	AZA	Also ulcerative colitis patients; many lost of follow-up
	Reinshagen, 2007 <sup>104</sup>	Steroid withdrawal	32	44	6 months	AZA	
	Reinisch, 2010 <sup>95</sup>	Maintenance of post-operative remission	41	100	12 months	AZA	Relapse rate 0%
	Ardizzone, 2004 <sup>96</sup>	Maintenance of post-operative remission	69	83	24 months	AZA	Relapse rate 17%
Retrospective	Treton, 2009 <sup>91</sup>	Maintenance of remission	-	-	64 months	AZA	Longest duration assessed on AZA
Cochrane Review	Prefontaine, 2009 <sup>10</sup>	Maintenance of remission	208	71	-	AZA	Placebo 55%; high dose of AZA more effective
	Prefontaine, 2010 <sup>8</sup>	Induction of remission	209	54	-	AZA/6-MP	Placebo 33%

AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine.

clinical response was found.<sup>105</sup> Also Lowry *et al.* in a retrospective study, and González-Lama *et al.* in a prospective study, failed to find any correlation with 6-TGN levels and clinical efficacy, probably because of a different assay method, patient inclusion bias or methodological inconsistencies (Table 2).<sup>106–108</sup> To explain these conflicting results, one possible hypothesis is that one nucleotide in particular, 6-TGTP, is related to thiopurine activity and clinical outcome.<sup>38</sup> Indeed, the quantification of 6-TGTP may be more relevant for monitoring thiopurine therapy. The predominant presence of 6-TGTP, associated with a 6-TGDP level less than 15% of global 6-TGN, is a predictive factor of a good therapeutic response to thiopurines.<sup>38</sup> Finally, as it regulates 6-TGN production, TPMT activity is an important determinant of clinical response. Ansari *et al.* showed that a TPMT activity below 35 pmol/h/mg of haemoglobin was associated with a greater chance of clinical response (81% vs. 43%;  $P < 0.001$ ).<sup>105</sup> Similarly, Cuffari *et al.* determined,

in a prospective study of 43 patients, that TPMT activity below 15.3 U/mL RBC is associated with a sixfold higher response rate to AZA.<sup>102</sup> Conversely, there is an increased risk of resistance to thiopurines in patients with high TPMT activity, over 14 U/mL RBC (OR, 0.21; 95% CI, 0.06–0.71;  $P = 0.009$ ).<sup>18</sup> In these patients, conventional AZA daily dosage (2.0–2.5 mg/kg) is probably insufficient to achieve therapeutic 6-TGN levels, requiring an increased dosage up to 3.0 mg/kg/day, as suggested by Cara *et al.*<sup>43</sup>

For therapy optimisation, the addition of a XO inhibitor, allopurinol, has been proposed.<sup>109, 110</sup> Indeed, high TPMT activity can result into an unfavourable metabolite ratio, i.e. low 6-TGN and high 6-MMP(R) levels, and drug–drug interaction thiopurine–allopurinol shunts the catabolism of 6-MP towards 6-TGN production. Allopurinol 100 mg combined with 25–50% of the original thiopurine dose safely improved disease activity and reduced steroids requirement in 20 IBD nonresponder

Table 2   Median 6-TGN levels in patients in remission and in patients with active disease						
Data collection	Author, year	Disease	Number of patients assessed	Time delay to 6-TGN assay after initiation	6-TGN reference method assay	6-TGN level (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> RBC)
						Patients in remission      Patients with active disease
Prospective	Cuffari, 2001 <sup>99</sup>	IBD	82	3 months	Lennard, 1992; modified	316      176 P < 0.01
	Dublinsky, 2000 <sup>98</sup>	Paediatric IBD	92	4 months	Lennard, 1992; modified	312      209 P < 0.004
	Hanai, 2010 <sup>228</sup>	Ulcerative colitis	170	12 months	Erdmann, 1990; modified	322      204 P < 0.001
	Hindorf, 2006 <sup>30</sup> Reinshagen, 2007 <sup>104</sup>	IBD Crohn's disease	27 39	5 months 4 months	Lennard, 1992 Lennard, 1992	176      163 222      222 NS      NS
Retrospective	González-Lama, 2011 <sup>108</sup> Wright, 2004 <sup>101</sup>	IBD	70	6 months	Dervieux, 2005	427      318 P = 0.9
	Achkar, 2004 <sup>229</sup>	IBD	60	3 months	Lennard, 1992; modified	236      175 320*      215* P < 0.04 P < 0.003
	Andoh, 2008 <sup>230</sup>	IBD	83	4 months	Erdmann, 1990; modified	343      233 P < 0.05
	Belaiche, 2001 <sup>231</sup> Goldenberg, 2004 <sup>158</sup>	Crohn's disease IBD	22 74	3 months 2.5 months	Lennard, 1992 Erdmann, 1990	166      160 325*      223* NS      NS
	Gupta, 2001 <sup>100</sup> Kwan, 2008 <sup>232</sup> Lowry, 2001 <sup>106</sup>	Paediatric IBD IBD IBD	101 39 170	4 months 1 month 3.5 months	Erdmann, 1990 Lennard, 1992 Erdmann, 1990	217      173 236*      202* 131      139 NS      NS (P = 0.09)
6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; RBC, red blood cells; IBD, inflammatory bowel disease.						
A conversion factor of 1.6 is required to compare results between Erdmann et al. <sup>233</sup> and Lennard et al. <sup>234</sup> method assay (Shipkova et al. <sup>235</sup> ).						
* Mean 6-TGN level reported.						

patients.<sup>83</sup> In a larger retrospective study, Ansari *et al.* also found this strategy useful to increase thiopurine response and to avoid some thiopurine adverse events.<sup>111</sup> It appeared to be safe and effective in a long term follow-up of 42 months.<sup>112</sup> Rahhal *et al.* also showed an improvement in 13 paediatric IBD patients with initially elevated serum transaminases.<sup>113</sup> Specially, adding allopurinol and lowering the thiopurine dose increases the 6-TGN levels, while it decreases 6-MMP(R) levels which are related to hepatotoxicity. This strategy needs to be reserved for selected cases and used with careful management and monitoring.<sup>109</sup>

Another approach for increasing 6-TGN levels is the addition of 5-aminosalicylic acid [5-ASA or mesalazine (mesalamine)]. This combination is frequently used in IBD, mainly for the local anti-inflammatory effect of 5-ASA.<sup>114</sup> Furthermore, an alteration in thiopurine metabolism caused by 5-ASA combination has been described, leading to an increase in 6-TGN levels.<sup>115, 116</sup> In a prospective study on 29 IBD patients with a stable dose of AZA, consecutive 4-week courses of 2 g and 4 g of 5-ASA increased 6-TGN levels from  $243 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  to  $326 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  ( $P = 0.001$ ) and to  $396 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$  ( $P = 0.011$ ), with constant 6-MMP(R) levels.<sup>117</sup> However, this association will probably results in both increase of clinical efficacy and myelotoxicity risk. The increase of 6-TGN levels is mainly due to an increase of 6-TGDP and 6-TGTP, the latter controlling the pharmacological activity of thiopurines.<sup>118</sup> Even if an *in vitro* inhibition of TPMT by 5-ASA has been described,<sup>115, 119</sup> *in vivo* effects of 5-ASA co-treatment on 6-MMP(R) levels are conflicting.<sup>105, 117, 118, 120</sup> To date, the underlying mechanism of this interaction remains unclear. Further clinical trials are required to assess the additional benefit of 5-ASA in association with thiopurines.<sup>121</sup>

More recently, the combotherapy azathioprine with an anti-TNF drug, such as infliximab, showed better remission rate than the use of each drug alone: 56.8% of corticosteroid-free remission at week 26 with combotherapy, vs. 44.4% for infliximab ( $P = 0.02$ ) and 30% for azathioprine ( $P < 0.001$ ).<sup>86</sup> Nevertheless, in this study, patients with decreased TPMT activity, who were more likely to have a response to AZA, were excluded. A drug-drug interaction between infliximab and azathioprine could led to a brief increase of 6-TGN levels, which could be related to a favourable response in this association.<sup>122</sup> Thus, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease, combotherapy can be considered in early disease for fast remission.<sup>86, 87</sup>

## Toxicity

Adverse events can be classified as two types according to thiopurine metabolism. First, dose dependent toxicity, related to intracellular concentration of active metabolites, which can appear months to years after the initiation of therapy. The most serious dose dependent adverse events are bone marrow (myelosuppression) and liver toxicities. Second, there is dose independent toxicity, as myalgia, flu-like symptoms, rash and acute pancreatitis.

**Haematologic toxicity.** Haematologic toxicity, mainly represented by mild leucopenia (white blood cells [WBC]:  $2.0\text{--}4.0 \times 10^9/\text{L}$ ) and neutropenia (absolute neutrophil count [ANC]  $<1.5 \times 10^9/\text{L}$ ), is the most common side effect of thiopurines.<sup>123, 124</sup> At conventional dosage, it occurs in IBD patients between 2%<sup>125</sup> and 10.5%,<sup>126</sup> depending on length of follow-up and how leucopenia is defined. In a 27-year retrospective cohort of 739 IBD patients, 3.8% of them developed leucopenia, including 1.2% with severe leucopenia (WBC  $<2.0 \times 10^9/\text{L}$ ).<sup>123</sup> Myelotoxicity can occur abruptly at any time during therapy, but often early during the first months, beginning from 2 weeks after introduction of thiopurine.<sup>123</sup> Blood count monitoring is required regularly throughout therapy, as it is usually normal 1 month before the occurrence of severe leucopenia.<sup>123</sup> Myelotoxicity is usually quickly reversible when drug dose is lowered by 50% or discontinued.<sup>123, 125</sup> A meta-analysis including 8302 IBD patients, from 66 studies, treated with thiopurines, showed a myelotoxicity incidence rate of 3% per patient and per year, and 0.9% for severe myelotoxicity, defined by an ANC below  $1 \times 10^9/\text{L}$ .<sup>127</sup> However, when only studies with less than 12 months of follow-up were included, the myelotoxicity incidence rate rose to 11%.<sup>127</sup> Severe myelosuppression, including leucopenia, thrombocytopenia and sometimes pancytopenia, is reported in IBD patients, as well as other diseases.<sup>17, 128–135</sup> It can be lethal in approximately 1% of patients who develop myelotoxicity.<sup>127</sup> Among patients experiencing myelotoxicity, the cumulative risk of infection, preferentially from the oral cavity, mucous membranes or skin, is approximately 6.5%.<sup>127</sup> Incidence of myelotoxicity does not seem to be related to thiopurine dosage.<sup>127</sup> Isolated mild thrombocytopenia is also possible, occurring in about 2% of treated patients in the 27-year experience cohort.<sup>123</sup>

Myelosuppression occurrence is strongly linked to high 6-TGN blood levels and low TPMT activity.<sup>80, 81, 98, 136</sup> Indeed, 6-TGN intra-erythrocyte levels

represent an indirect biomarker of 6-TGN accumulation into bone marrow, which results in myelotoxicity.<sup>97, 124, 137</sup> Patients with reduced or undetectable TPMT activity, due to genetic alterations, exhibit a preferential metabolism towards 6-TGN through HPRT pathway and consequently are predisposed to bone marrow suppression.<sup>18, 127, 128, 138, 139</sup> This evidence is strongly supported by a TPMT knockout murine model.<sup>140</sup> Regarding patients with intermediate TPMT activity, a large meta-analysis, including 4306 patients from 47 studies, showed an OR of 4.09 (95% CI, 3.20–5.48;  $P = 0.001$ ) for developing leucopenia, compared with normal TPMT activity.<sup>82</sup> Yet, this meta-analysis included heterogeneous retrospective and prospective studies, with mostly mild rather than severe leucopenia, and different TPMT testing methods. Furthermore, even if nearly all the TPMT-deficient patients treated with a standard dosage of thiopurine exhibit myelosuppression, TPMT deficiency accounts for a quarter of all the cases of myelosuppression under thiopurine treatment.<sup>141, 142</sup> However, patients with TPMT deficiency can be treated by thiopurines in a dose-adjusted manner without haematological adverse events.<sup>143–146</sup> Interestingly, Hindorf *et al.* reported an increased haematological risk in patients with high concentrations of methylated derivatives.<sup>30</sup> In this prospective study of 60 patients, 10 cases of myelotoxicity were observed, 6-TGN concentrations were not predictive of the development of myelotoxicity, and mean TPMT was high (11.9 U/mL RBC). A regression analysis showed that the only independent factor associated with myelotoxicity was the maximum 6-MeTIMP concentration (OR, 25.1; 95% CI, 1.4–467.1;  $P = 0.03$ ) and high levels of 6-MeTIMP (10 450 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC vs. 4550 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC;  $P = 0.046$ ) were measured in patients with myelotoxicity.

In conclusion, screening of TPMT deficiency before treatment initiation could avoid a quarter of the haematological events under thiopurine.

**Liver toxicity.** Thiopurine-induced liver injuries can be divided into three syndromes: hypersensitivity, idiosyncratic cholestatic reaction and nodular regenerative hyperplasia (NRH), i.e. presumed endothelial cell injury with raised portal pressures resulting in veno-occlusive disease.<sup>147</sup>

Patients treated with thiopurines can exhibit mild, transient or reversible, elevation in serum transaminases, which is the most common biological abnormality.<sup>20, 98</sup> Thiopurines can cause both cytolytic and cholestatic liver injury.<sup>148</sup> Present *et al.* reported a hepatitis rate of 0.3%

in a population of 396 IBD patients treated for 3 years, whereas Kirschner, in a cohort of 95 paediatric patients, observed a serum transaminase increase twice the upper normal value in 13.7% of the patients, all resolving spontaneously or after thiopurine dose reduction.<sup>125, 126</sup> This discrepancy is probably caused by a variable hepatitis definition, as Present *et al.* reported clinical hepatitis with jaundice.<sup>125</sup> In the same manner, between 8.6%<sup>149</sup> and 21%<sup>150</sup> of patients have increased serum transaminase levels after thiopurine therapy. The first prospective study to assess thiopurine hepatotoxicity was conducted by Bastida *et al.* in 2005.<sup>151</sup> A total of one hundred and sixty-one IBD patients treated with conventional dosage were followed for 9 months. Hepatotoxicity, with a transaminase plasma level at least twice the upper normal value, was detected in 10% of the patients, and co-treatment by corticosteroids was found as a risk factor.<sup>151</sup> A recent systematic review, including 3485 IBD patients, almost all from retrospective studies, estimated an overall hepatotoxicity prevalence of 3.4%, with a yearly incidence of approximately 1.4%.<sup>147</sup> Again, there is no explicit drug-induced liver injury definition provided in most studies. A slightly elevated rate of 5% of hepatotoxicity, defined as transaminase level twice above the upper normal value, was found by Gisbert *et al.* in a retrospective study of a large group of 786 IBD patients.<sup>152</sup> The hepatotoxicity incidence was approximately 2.6% per patient-year.<sup>152</sup> Hepatotoxicity usually develops early after thiopurine introduction, after a median of 1.5–3 months.<sup>151, 153, 154</sup> Thus, for delayed hepatotoxicity during thiopurine medication, other potential causes should be considered, such as viral or alcoholic hepatitis. It should be noted that most patients spontaneously normalise their serum transaminases despite continuing AZA/6-MP; the remainder resolve after drug tapering or discontinuation. No fatal case was reported.<sup>147, 151, 152</sup>

Underlying mechanisms for thiopurine-induced liver injuries are unknown. Although some cases appear in a hypersensitivity context, hepatic adverse events seem to be related to the presence of high methylated derivative levels, especially 6-MMP.<sup>20, 27, 85, 97, 98, 155, 156</sup> As TPMT activity in the liver is similar to that in the erythrocytes, this suggests that high TPMT activity could be a determinant factor for thiopurine-induced hepatotoxicity.<sup>157</sup> A cut-off 6-MMP(R) concentration of 5700 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC has been established in a prospective study of IBD paediatric patients, above which there is a high risk of hepatotoxicity.<sup>98</sup> Hande *et al.* also showed a positive correlation ( $P < 0.001$ ) between higher 6-MMP(R) levels



and higher transaminase levels.<sup>116</sup> A prospective study on 43 leukaemic patients also indicate that elevated transaminases are related to high levels of methylated metabolites ( $P < 0.001$ ).<sup>156</sup> However, in a prospective study of 74 IBD patients, of which 12.2% had above 5700 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC, none developed hepatotoxicity.<sup>158</sup> This result is in line with the findings from the prospective study ( $n = 71$ ) of Reinshagen *et al.* in which 28% of patients with 6-MMP(R) concentrations above 10 000 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC did not exhibit hepatotoxicity.<sup>104</sup> Thus, duration of exposure to high 6-MMP(R) levels may also be an important determinant, as well as other unidentified factors.<sup>98</sup> The different quantification methods of 6-MMP(R) may play a role in those discrepancies.<sup>27, 159</sup> An optimisation strategy in patients with preferential 6-MMP metabolism experiencing liver toxicity is the combination with allopurinol. As previously described, this combination leads to dramatically diminished 6-MMP(R) levels and can overpass hepatotoxicity.<sup>112, 160, 161</sup> A splitting of the daily regimen in twice daily have been proposed with promising results in a preliminary study on 12 patients.<sup>162</sup> Some authors also discuss a possible decreased hepatotoxicity risk of 6-MP compared with AZA, but to date, only weak evidence and scarce data are available, and the risk is very likely the same.<sup>147, 152, 154, 163</sup>

Another kind of thiopurine hepatic toxicity, much rarer, is NRH, whose symptoms are associated with the complication of portal hypertension and eventually the need for liver transplant.<sup>164</sup> Only a few cases have been reported in the literature.<sup>165–167</sup> It is a late complication of thiopurine treatment, as the median time to develop NRH is approximately 50 months.<sup>168, 169</sup> A recent study of 37 cases estimated a cumulative incidence of 1.25% at 10 years.<sup>168</sup> Two major risk factors have been identified: male sex and small bowel resection >50 cm, with a sevenfold increased risk to develop NRH for each factor.<sup>169</sup> Those patients require a close monitoring, specifically with regular platelet count and functional liver tests, for early diagnosis of NRH before initiation of clinical symptoms.<sup>169</sup> Abdominal Doppler echography and upper gastrointestinal endoscopy are useful for screening portal hypertension. In case of abnormalities, magnetic resonance imaging (MRI) is advocated as it presents a high specificity and sensitivity profile to detect pathohistological alteration related to NRH.<sup>170, 171</sup> Although some cases of NRH are associated with the presence of TPMT heterozygous genotype, elevated 6-TGN levels or 6-TG therapy, no clear pathophysiological hypothesis has been proposed.<sup>172–175</sup>

**Pancreatic toxicity.** Pancreatitis is frequently associated with epigastric pain, nausea, vomiting, abdominal pain, flu-like symptoms, rash, arthralgia and fever. It is a part of allergic-like, dose-independent, adverse reactions.<sup>21, 27, 28</sup> In pancreatitis, the serum amylase level is elevated in almost all cases.<sup>125</sup> When the medication is discontinued, symptoms disappear, serum amylase value return to normal within a mean of 3 days, and no complications such as chronic pancreatitis have been reported.<sup>176</sup> In a retrospective investigation of 6-MP safety in 396 patients, the prevalence of pancreatitis was 3.3%.<sup>125</sup> All pancreatitis cases occurred in a median time of 23 days after the introduction of a thiopurine.<sup>125</sup> A similar rate of 4% has been reported in a paediatric cohort.<sup>126</sup> Other studies found a rate between 3.2%<sup>17</sup> and 7.4%.<sup>30</sup> Considering the different definitions, Dubinsky *et al.* reported 8% elevated amylase and lipase levels, with only 1% clinically overt pancreatitis.<sup>98</sup> This is in accordance with a large meta-analysis ( $n = 214$  patients) which reported an incidence of 1.4% pancreatitis causing treatment withdrawal.<sup>8</sup>

Pathophysiological mechanism of pancreatitis remains unclear, and it may be mediated by an allergic mechanism.<sup>27, 177, 178</sup> Thus, thiopurines should not be re-challenged once it has caused pancreatitis.<sup>126, 177</sup> To date, no correlation has been found with thiopurine metabolite 6-TGN and 6-MMP(R) blood levels, and it is not related to thiopurine dosage.<sup>98, 177</sup> However, Hindorf *et al.*, in a prospective study, found lower maximum 6-MeTIMP concentrations in patients with pancreatitis (1650 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC) than in those without pancreatitis (5600 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC;  $P = 0.011$ ), while no significant differences in maximum 6-TGN concentrations were noted.<sup>30</sup>

For patients exhibiting immune-allergic reactions on AZA or 6-MP such as pancreatitis, an alternate thiopurine drug, namely 6-TG, has been proposed.<sup>179</sup> This drug is directly converted into 6-TGN by HPRT; i.e. the extensive thiopurine metabolism is bypassed, including the TPMT step. In two short-term prospective studies, including patients with hypersensitivity reactions to AZA or 6-MP 6-TG was well tolerated and effective, despite very high 6-TGN levels.<sup>180, 181</sup> However, long term experience in leukaemia, and subsequently closer assessment in IBD, showed a strong association with elevation of liver enzymes and NRH.<sup>175</sup> It is unclear whether an elevated dose (median: 40 mg/day) of 6-TG, leading to very high 6-TGN levels (median: 1200 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC) is implicated in the pathophysiology of this toxicity.<sup>182</sup> In

any case, 6-TG needs further evaluation before it can be recommended in IBD.

**Gastrointestinal intolerance.** Gastrointestinal intolerance, principally represented by abdominal pain, nausea and vomiting, mainly appears within the first weeks of treatment, and represents more than half of adverse events.<sup>153, 178</sup> It occurs in approximately 5–20% of treated patients, depending on the study.<sup>30, 95, 105, 126</sup> Although a retrospective study did not find a correlation between TPMT activity and gastrointestinal intolerance, a large prospective study showed that gastrointestinal intolerance is more frequent in patients carrying an heterozygous genotype for TPMT (37%) than in those with normal TPMT (7%;  $P < 0.001$ ).<sup>105, 153</sup> Marinaki *et al.*, in a cohort study, also reported that the TPMT heterozygous genotype is significantly associated with more nausea and vomiting than the wild-type genotype (OR, 5.5; 95% CI, 1.4–21.3;  $P = 0.02$ ), which is consistent with a slightly lower TPMT median activity in patients from this study.<sup>19</sup> Nevertheless, the role of TPMT and its mechanism of action in gastrointestinal intolerance remains totally uncertain and need to be assessed. Gastrointestinal intolerance leads to treatment discontinuation in less than 10% of the treated patients, but it could be a serious cause of poor compliance in a much larger number of patients.<sup>153</sup> Gastrointestinal intolerance seems to be related to thiopurine dosage: reintroduction at a lower dosage after a short cessation can be successful, while splitting regimen to twice daily did not conclude.<sup>183</sup> Moreover, some authors consider that a switch to 6-MP is a therapeutic alternative for gastrointestinal intolerant patients on AZA.<sup>183–186</sup> Indeed, early digestive intolerance may be linked to the imidazole derivative, after the cleavage by GST of AZA into 6-MP.<sup>186</sup> Even if this clinical practice seems to be useful in small studies and case reports, it has still to be widely assessed.

### NEWLY IDENTIFIED PHARMACOGENETIC FACTORS CONTRIBUTING TO VARIABILITY IN THIOPURINE RESPONSE

#### Inosine triphosphatase

Inosine triphosphatase (ITPase) is a widely expressed enzyme in tissues, including erythrocytes and leucocytes.<sup>187, 188</sup> In normal cells, inosine diphosphate (IDP) and inosine triphosphate (ITP) are produced by kinase from inosine monophosphate (IMP), and ITPase converts ITP back to IMP, to protect cells from the accumulation of potentially harmful nucleotides which may be

incorporated in nucleic acids.<sup>187</sup> In patients treated with thiopurines, this futile cycle also exists, and ITPase hydrolyses 6-thioinosine triphosphate (6-TITP) into 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP). An ITPase deficiency therefore leads to toxic accumulation of 6-TITP.<sup>19</sup> One genetic missense mutation, 94C>A (Pro32 to Thr), identified in 6–7% of Caucasians and Africans and in up to 19% of Asians, has been associated with a completely deficient enzyme activity.<sup>189, 190</sup> An assessment of ITPase activity in erythrocytes, well correlated to genotype, has been proposed.<sup>191</sup> In 62 patients experiencing adverse drug reactions to AZA therapy, the ITPase 94C>A mutation was found in 18 patients.<sup>19</sup> More specifically, a significant association was found for rash (OR, 10.3; 95% CI, 4.7–62.9;  $P = 0.02$ ), pancreatitis (OR, 6.2; 95% CI, 1.1–32.6;  $P = 0.049$ ) and flu-like symptoms (OR, 4.7; 95% CI, 1.2–18.1;  $P = 0.03$ ), compared with control patients without adverse events after 3 months of AZA.<sup>19</sup> The association with flu-like symptoms is also reported by Ansari *et al.* (OR, 4.13; 95% CI, 1.23–13.94;  $P = 0.014$ ).<sup>105</sup> Moreover, in a prospective study including 71 patients with Crohn's disease, drop-out attributable to AZA-related side effects was significantly associated with ITPase 94C>A mutation (OR, 7.8; 95% CI, 2.1–29.1;  $P = 0.002$ ).<sup>192</sup> Another large retrospective study of 262 IBD patients showed a higher risk of leucopenia in patients with the ITPase 94C>A genotype (OR, 3.5; 95% CI, 1.12–10.97;  $P = 0.046$ ).<sup>138</sup> This result has also been reported in 244 ALL children treated with thiopurines, associated with an increased blood level of 6-MMP(R) but not 6-TGN.<sup>193, 194</sup> Even so, several other studies did not report any significant association.<sup>195–197</sup> In a short communication, Gearry *et al.* did not find any over-representation of the ITPase 94C>A polymorphism in 73 patients intolerant to AZA therapy with the same adverse events.<sup>198</sup> In the study of Gearry *et al.* only eight patients carried this mutation, all heterozygous.<sup>198</sup> This is consistent with a meta-analysis including 751 patients from six studies.<sup>199</sup> In these studies, there were very few homozygous patients, and a large prospective study including these patients is required to assess the effectiveness of ITPase genotyping.

#### Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferases are cytosolic enzymes, belonging to a super-family of enzymes responsible for the conjugation of a number of xenobiotics. Some of them are abundantly expressed in the human liver and are involved in the early metabolism of AZA. GSTs catalyse the release of 6-MP from its pro-drug AZA.<sup>22, 200</sup> The

isoforms GSTs A1-1, A2-2 and M1-1, all abundantly expressed in human liver, exhibit the highest activity towards AZA.<sup>22</sup> Their catalytic activities depend on genetic polymorphisms. Concerning GST A2-2, five allelic variants were associated with high activity towards AZA, but specifically one allelic variant, GST-A2-2\*E, displays a three- to fourfold elevated activity.<sup>201</sup> Based on these results, Elkund *et al.* suggested that a high hepatic GST activity in combination with a high dose of AZA could lead to glutathione depletion and cause cell damage.<sup>22</sup>

Studying the influence of three GST isoenzymes (GST-M1, GST-P1, GST-T1) in 70 IBD patients, Stocco *et al.* found a correlation between GST-M1 and adverse events. The presence of the wild-type GST-M1 genotype, related to high enzyme activity, is associated with a small, but significant, increased probability of developing adverse events (OR, 0.18; 95% CI, 0.037–0.72;  $P = 0.007$ ), especially lymphopenia (OR, 0.15; 95% CI, 0.013–1.08;  $P = 0.032$ ).<sup>202</sup> Therefore, the null genotype affords protection against lymphopenia. Similarly, a small trend of under-representation of the null genotype in patients exhibiting pancreatic toxicity has been reported.<sup>202</sup> According to the high prevalence of the GST-M1 null genotype, around 50% of Caucasians and Asians, its implication in clinical drug response should be prospectively assessed.<sup>203, 204</sup>

#### Xanthine oxidase

Xanthine oxidase is an early detoxifying enzyme in the metabolism of thiopurines, which oxidises 6-MP to 6-thiouric acid, an inactive metabolite excreted in urine.<sup>28, 205</sup> XO is an ubiquitous cytoplasmic enzyme, extensively presents within the small intestine and liver, which largely contributes to first-pass metabolism of dietary purines and thiopurines.<sup>206</sup> XO deficiency is a very rare disorder, with an incidence of approximately 1/70 000, and severe toxicity has been reported with full dose of AZA.<sup>207, 208</sup> However, XO activity presents a four- to 10-fold inter-individual variation, which could be involved in the clinical response to thiopurines.<sup>21, 207, 209</sup> Similarly, there is different activity between ethnic groups and gender.<sup>209</sup> A variety of SNPs have been associated with decreased XO in the Japanese population, and preliminary evidence suggests an alteration in thiopurine metabolite levels.<sup>210, 211</sup> To exert its oxidising activity, XO requires an essential cofactor, molybdenum, of which deficiency also alters enzymatic activity.<sup>212, 213</sup> Moreover, some XO products as oxidised purine metabolites, inhibit TPMT, probably resulting in a higher level of 6-TGN.<sup>47</sup>

Finally, as described above, the use of a common XO inhibitor, allopurinol, in combination with a reduced dosage of thiopurine is a useful strategy to achieve therapeutic 6-TGN levels and/or alleviate hepatotoxicity related to 6-MMP(R), although the exact mechanism remains unclear.<sup>109, 110, 160</sup>

#### Aldehyde oxidase

Aldehyde oxidase (AOX), another oxidase enzyme widely distributed in the organism, is involved in early thiopurine metabolism.<sup>214</sup> It catalyses the 8-hydroxylation of 6-MP or AZA into inactive compound.<sup>215</sup> The presence of a SNP on the AOX gene has been described, associated with a lack of clinical response to AZA (OR, 2.54; 95% CI, 1.06–6.13;  $P = 0.035$ ) with similar 6-TGN levels in 192 patients.<sup>212</sup> Moreover, when this SNP is combined with TPMT activity, it allows predicting the probability of a therapeutic response to AZA, which is between 33% and 86%, in patients with both markers unfavourable and favourable respectively.<sup>212</sup> Alternatively, no difference in adverse events has been observed in this study. The frequency of AOX polymorphism is unknown in the general population, and its clinical implication has yet to be explored.

#### Methylene tetrahydrofolate reductase

Besides genetic deficiency, an alternative aetiology for decreased TPMT enzyme activity could be related to a reduced availability of its cofactor, SAM. After the methyl transfer catalysed by TPMT, SAM is converted into S-adenosyl L-homocysteine, which is thereafter recycled in SAM with the folate cycle.<sup>216</sup> Polymorphisms in enzymes involved in this cycle could alter SAM production and modify TPMT activity. In particular, 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) presents different genetic polymorphisms, two of which occur in 20% of the general population and are associated with decreased enzyme activity.<sup>216</sup> A genetic study on 86 healthy individuals showed an influence of these MTHFR genetic polymorphisms on TPMT activity.<sup>217</sup> However, Breen *et al.*, in a study of liver recipient patients, showed that these two MTHFR mutations were not significantly associated with AZA intolerance.<sup>172</sup> Nevertheless, in this study, donor rather than recipient genotype would probably have better predicted AZA intolerance, as liver is the main site for 6-MP methylation.<sup>157</sup> Moreover, antifolate drugs such as methotrexate or trimethoprim exert a pharmacological inhibition of the folate cycle, which could result in variations of TPMT activity and 6-TGN production.<sup>218, 219</sup>

## ABCC4

ABCC4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4, formerly named MRP4), a nucleotide efflux transporter for purines is expressed in many cells, including myeloid progenitors.<sup>220, 221</sup> It protects the cell from the accumulation of cytotoxic thiopurine metabolites, and therefore it can also modify sensitivity and confer resistance to thiopurine therapy.<sup>220–222</sup> Thus, a common SNP, associated with a dramatically reduced ABCC4 function, has been identified in approximately 14–18% of the Japanese population and could probably be present in other ethnic groups.<sup>221–223</sup> In these patients, there is a significantly lower white blood cells count associated with an increase of 6-TGN levels, and the OR of carrying the ABCC4 variant and having leucopenia was 3.30 (95% CI, 1.03–10.57;  $P = 0.036$ ).<sup>223</sup> In addition, an *in vitro* study of leukaemic-resistant cells treated with 6-MP showed an up-regulation of ABCC4, while there is a down-regulation of the influx transporter SLC28A3, which could be related to treatment failure.<sup>25</sup> ABCC4 is related to thiopurine sensitivity, and its involvement in different populations has yet to be studied.

## THERAPEUTIC RECOMMENDATIONS

Thiopurine metabolism and its influence on drug response have raised considerable scientific interest, underlined by numerous studies on this topic in the literature of the past few years. Based on the literature data, we provide, hereafter, therapeutic recommendations for patients (i) initiating treatment and (ii) under thiopurine therapy.

### Initiation of thiopurine therapy

Current U.S. Food and Drug Administration (FDA) recommendations suggest that individuals should have their TPMT phenotype or genotype assessed before the initiation of AZA/6-MP therapy, to prevent myelotoxicity.<sup>224</sup> By contrast, the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) guidelines state that no recommendation can be made about routine assessment of TPMT phenotype or genotype prior to initiating thiopurine therapy.<sup>6</sup> These conflicting positions may partly explain that TPMT status, unsupported by most of the social welfare systems, is determined in clinical practice by less than half of the experts in the field of IBD.<sup>225</sup>

Very recently, the first guideline for thiopurine starting dose according to TPMT phenotype/genotype has been developed by the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium from the U.S. National Institutes of Health.<sup>226</sup> When patients with normal/high activity

(homozygous wild-type) should receive an AZA standard dose of 2.5 mg/kg/day, a reduction to 30–70% of the full dose is necessary in patients with an intermediate activity (heterozygote). Particular attention should be raised to patients with low/absent activity (homozygous mutant or compound heterozygote): an alternative drug should be considered or else AZA may be prescribed but with a dramatically reduced dose by 10-fold, administered thrice weekly, and associated to a close monitoring. For patients with intermediate and low/absent TPMT activity, a therapeutic drug monitoring (TDM) 4 weeks after treatment initiation is useful to confirm the dosage adjustment (Figure 2).

Furthermore, TPMT phenotyping prior to treatment will allow to identify patients with very high activity that can exhibit resistance to standard doses of thiopurines. These patients could benefit from an increase in AZA dosage, up to 3.0 mg/kg/day.

Finally, as thiopurines remain the backbone of therapy for IBD, we recommend determining the TPMT status at diagnostic stage and mentioning it in the patient medical record.

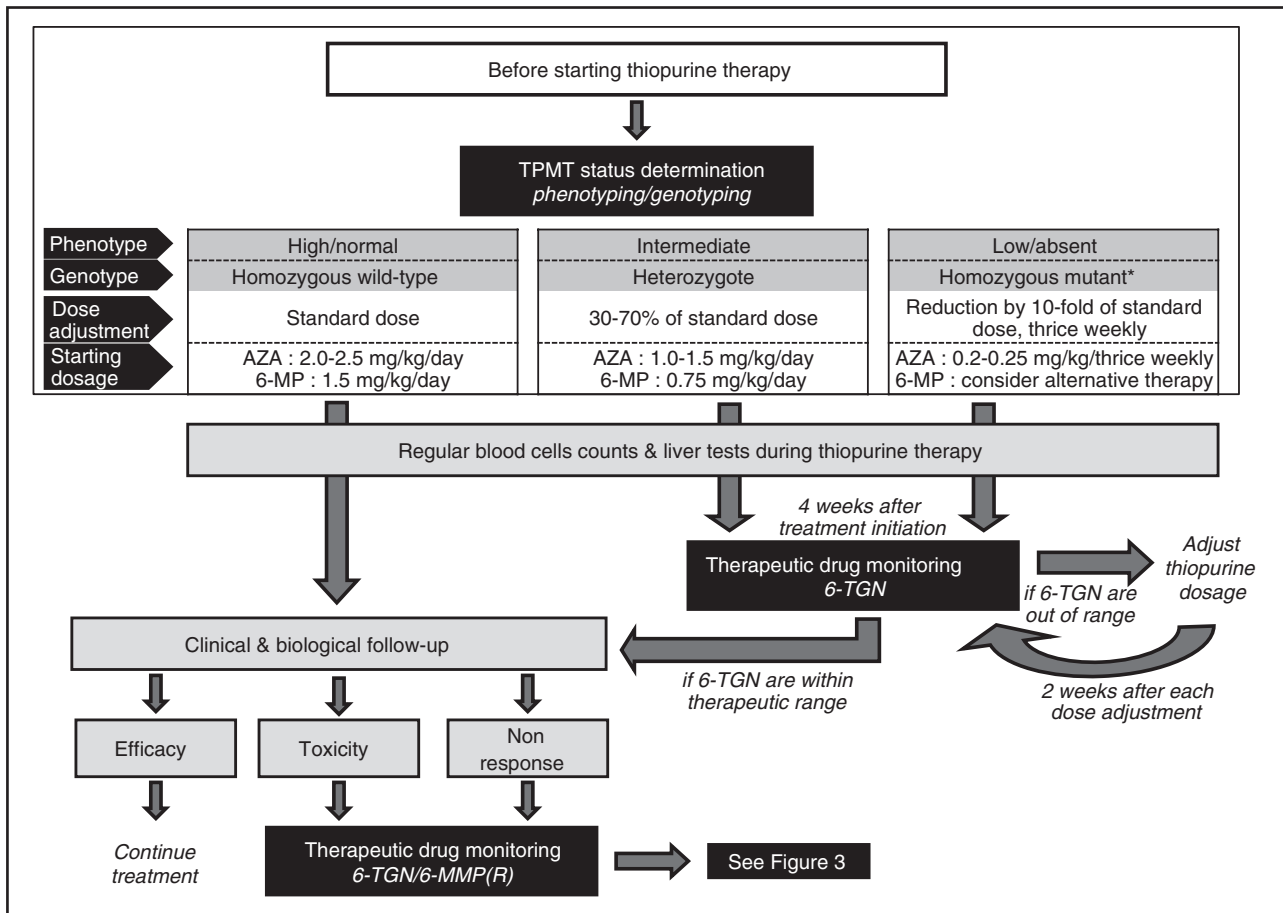
### Patients under thiopurine therapy

In a recent clinical worldwide practice survey, IBD experts considered useful a TDM, based on thiopurine metabolites (6-TGN and 6-MMP(R)) measurement, for optimising therapy.<sup>225</sup> Moreover, physicians who have access to TDM are less prone to switch to another drug class. In this survey, similar to TPMT status determination, the major predictor for using TDM was the reimbursement by social welfare systems.<sup>225</sup> Indeed, TDM is a useful tool to elucidate mechanisms of clinical resistance or poor response, or to prevent and explain adverse events (myelotoxicity, hepatotoxicity). In the latter, it is very important to explore other etiologies such as viruses (e.g., cytomegalovirus or Epstein–Barr virus), vitamin deficiency (e.g., folate or vitamin B12), or other treatments leading to drug–drug interactions. Thus, before discontinuing thiopurine therapy for toxicity or resistance, a metabolites measurement is recommended to confirm its aetiology and allowing dose adjustment.

According to the literature data, we describe hereafter five metabolite profiles, identifying five groups of patients. Consequently, we propose a specific therapeutic management for each group (Figure 3).

**Group 1 – Patients with non-compliance to thiopurine therapy.** Undetectable or very low metabolite levels are





**Figure 2 |** Therapeutic algorithm for thiopurine therapy management. For patients before initiating thiopurine therapy: recommended starting dose of thiopurines, depending on TPMT phenotype/genotype (Adapted from Relling et al.<sup>226</sup>) For patients under thiopurine therapy: recommendations of therapeutic monitoring, based on thiopurine metabolites measurement [6-TGN and 6-MMP(R)]. TPMT, thiopurine S-methyltransferase; AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMP(R), 6-methylmercaptopurine ribonucleotides. \* Or compound heterozygote.

probably caused by non-compliance to therapy. Therapeutic patient education is required.

**Group 2 - Patients with thiopurine underdosing.** These patients have sub-therapeutic levels of both metabolites. Thiopurine dose escalation can increase the likelihood of remission.

**Group 3 - Patients pharmacologically resistant to thiopurines.** Low 6-TGN levels and poor or nonresponse at standard thiopurine dosage are frequently associated with very high TPMT activity. Thus, an increase in thiopurine dosage can expose patients to high 6-MMP(R) levels and hepatotoxicity. Before switching to another drug class, treatment can be optimised by adding allopurinol 100 mg daily and decreasing thiopurine dosage to 25–50% of original

dose. Then, close monitoring of blood cells counts and liver tests is necessary. Repeat metabolites measurement 4 weeks after the addition of allopurinol should be performed.

**Group 4 - Patients with deficient TPMT activity.** High 6-TGN levels strongly expose patients to myelotoxicity. This metabolite profile, high 6-TGN and low 6-MMP(R), is associated with intermediate (heterozygote) or low/absent (homozygous mutant or compound heterozygote) TPMT activity. These patients require a reduced thiopurine dosage, as described above (Figure 2). Allow approximately 4 weeks to reach steady state after each dose adjustment.

**Group 5 - Patients with thiopurine overdose or with refractory disease.** High 6-TGN and 6-MMP(R) levels could reveal a thiopurine overdosage and result into

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
<b>TDM</b>	Low/absent 6-TGN and Low/absent 6-MMP(R)	Low 6-TGN and Low 6-MMP(R)	Low 6-TGN and High 6-MMP(R)	High 6-TGN and Low 6-MMP(R)	High 6-TGN and High 6-MMP(R)
	=	=	=	=	=
<b>Risk</b>	Inefficacy (false resistance)	Inefficacy or poor response	Poor response and/or hepatotoxicity	Myelotoxicity	Myelotoxicity and/or hepatotoxicity
	?	?	?	?	?
<b>Hypothesis</b>	Poor compliance to treatment	Underdosing	Very high TPMT activity <i>i.e.</i> pharmacological resistance to thiopurines	Deficient TPMT activity	Overdose or refractoriness to thiopurines
	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Action</b>	Therapeutic patient education	Increase thiopurine dosage	Add allopurinol 100mg/day and decrease thiopurine dosage (25-50% of original dose)	Decrease thiopurine dosage according to TPMT phenotype*	Switch to another drug if active disease

**Figure 3 |** Therapeutic drug monitoring, based on thiopurine metabolite profiles, in inflammatory bowel disease patients experiencing toxicity or resistance: what to do? TDM, therapeutic drug monitoring; 6-TGN, 6-thioguanine nucleotides; 6-MMP, 6-methylmercaptopurine; TPMT, thiopurine S-methyltransferase. \* Particular attention should be raised to patients with low/absent activity (homozygous mutant or compound heterozygote). Adapted from Dewit *et al.*<sup>109</sup>

adverse events, such as myelotoxicity or hepatotoxicity. This metabolite profile can also be related to refractoriness in patients presenting still an evolving disease after at least 6 months of treatment with high metabolites levels. Hence, poor or nonresponse is likely not supported by an unfavourable metabolite profile. Thiopurine refractory disease should be considered and a switch to another drug discussed.

### Thiopurine therapy management

Finally based on TPMT status determination prior to treatment, and then TDM in patients exhibiting toxicity or poor response, we propose a therapeutic algorithm allowing a dosage individualisation to optimise and secure the management of patients under thiopurine (Figures 2 and 3). This therapeutic algorithm cannot be used as a substitute for the current practice of regular monitoring of blood cells counts and liver tests.

Incorporating pharmacogenetic factors into therapeutic management is promising for ensuring maximal therapeutic response to thiopurines with a minimisation of the risk for adverse events in IBD patients. Clinical validation of newly identified biomarkers (ITPase, GST, XO,

AOX, MTHFR and ABCC4) is necessary before moving it into routine practice, even if they are promising for the future. To date, thiopurines offer the possibility to validate the importance of genetic polymorphisms for a personalised medicine and, consequently, pharmacogenetics will become a reality in clinical practice. However, prospective randomised trials including large population are warranted to provide strong evidence about the clinical utility of pharmacogenetic-based individualised therapy. Finally, as discussed by Lesko LJ<sup>227</sup> – Office of clinical pharmacology, U.S. FDA – “the more important question is, while more and more studies are being planned and/or conducted, should we accept and use our current knowledge about genetic factors to improve the quality” of thiopurine management and clinical outcome in our IBD patients.

### ACKNOWLEDGEMENTS

*Declaration of personal interests:* We thank Dr Denis Roche from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, for his useful advice and comments. *Declaration of funding interests:* None.

## REFERENCES

- Elion GB, Hitchings GH, Vanderwerff H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J Biol Chem* 1951; **192**: 505–18.
- Bean RH. The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. *Med J Aust* 1962; **49**: 592–3.
- Cosnes J, Nion-Larmurier I, Tiret E, Gendre J-P. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005; **54**: 237–41.
- Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 2009; **374**: 1617–25.
- Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; **130**: 940–87.
- Travis SPL, Stange EF, Lemann M, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; **55**(Suppl. 1): i16–35.
- Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; **123**: 132–42.
- Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(6):CD000545.
- Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2): CD000067.
- Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1): CD000067.
- Kader HA, Raynor SC, Young R, et al. Introduction of 6-mercaptopurine in Crohn's disease patients during the perioperative period: a preliminary evaluation of recurrence of disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; **25**: 93–7.
- D'Haens G. Prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; **1**: 476–81.
- Cuillerier E, Lémann M, Bouhnik Y, Allez M, Rambaud JC, Modigliani R. Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a retrospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; **13**: 1291–6.
- Travis S. Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; **13**: 1277–9.
- Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, Ardizzone S, et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 2089–96.
- Timmer A, McDonald JWD, Macdonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD000478.
- Schwab M, Schäffeler E, Marx C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 429–36.
- Ansari A, Hassan C, Duley J, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; **16**: 1743–50.
- Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, et al. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 181–7.
- Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; **122**: 904–15.
- Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**: 715–29.
- Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, Mannervik B. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol Pharmacol* 2006; **70**: 747–54.
- Kurtovic S, Grehn L, Karlsson A, Hellman U, Mannervik B. Glutathione transferase activity with a novel substrate mimics the activation of the pro-drug azathioprine. *Anal Biochem* 2008; **375**: 339–44.
- Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C, Albertoni F. Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**: 208–15.
- Peng X-X, Shi Z, Damaraju VL, et al. Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leuk Res* 2008; **32**: 799–809.
- Zaza G, Cheok M, Yang W, et al. Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after in vivo mercaptopurine treatment. *Blood* 2005; **106**: 1778–85.
- Al Hadithy AFY, de Boer NKH, Derijks LJJ, Escher JC, Mulder CJJ, Brouwers JRB. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis* 2005; **37**: 282–97.
- Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; **64**: 753–67.
- Zimm S, Collins JM, Riccardi R, et al. Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N Engl J Med* 1983; **308**: 1005–9.
- Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, et al. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; **55**: 1423–31.
- Derijks LJJ, Gilissen LPL, Engels LGJB, et al. Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 311–8.
- Pozler O, Chládek J, Malý J, et al. Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2010; **4**: 623–8.
- Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990; **30**: 358–63.
- Fairchild CR, Maybaum J, Kennedy KA. Concurrent unilateral chromatid damage and DNA strand breakage in response to 6-thioguanine treatment. *Biochem Pharmacol* 1986; **35**: 3533–41.

35. Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002; **51**: 143–6.
36. Tiede I, Fritz G, Strand S, *et al.* CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1133–45.
37. Poppe D, Tiede I, Fritz G, *et al.* Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol* 2006; **176**: 640–51.
38. Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, *et al.* 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; **3**: 1007–14.
39. Karner S, Shi S, Fischer C, *et al.* Determination of 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate and nucleoside diphosphate kinase activity in erythrocytes: novel targets for thiopurine therapy? *Ther Drug Monit* 2010; **32**: 119–28.
40. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, *et al.* Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312**: 537–45.
41. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 5810–6.
42. Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, *et al.* The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 2002; **62**: 102–9.
43. Cara CJ, Pena AS, Sans M, *et al.* Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 2004; **10**: RA247–54.
44. Woodson LC, Weinshilboum RM. Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. *Biochem Pharmacol* 1983; **32**: 819–26.
45. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase. Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol* 1983; **24**: 471–8.
46. Remy CN. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylease and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1963; **238**: 1078–84.
47. Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, Van Loon J, Ferber W, Weinshilboum RM. Purine substrates for human thiopurine methyltransferase. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 2135–8.
48. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; **32**: 651–62.
49. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, *et al.* Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 407–17.
50. Gisbert JP, Gomollón F, Cara C, *et al.* Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 1262–9.
51. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, *et al.* Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **60**: 89–96.
52. Cooper SC, Ford LT, Berg JD, Lewis MJV. Ethnic variation of thiopurine S-methyltransferase activity: a large, prospective population study. *Pharmacogenomics* 2008; **9**: 303–9.
53. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, *et al.* Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 1997; **62**: 60–73.
54. Szumlanski C, Otterness D, Her C, *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996; **15**: 17–30.
55. Garat A, Cauffiez C, Renault N, *et al.* Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem Pharmacol* 2008; **76**: 404–15.
56. Ujii S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT\*2 - \*24). *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 887–93.
57. Kham SKY, Soh CK, Aw DCW, Yeoh AEJ. TPMT\*26 (208F→L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol* 2009; **68**: 120–3.
58. Appell ML, Wennerstrand P, Peterson C, Hertervig E, Mårtensson L-G. Characterization of a novel sequence variant, TPMT\*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics* 2010; **20**: 700–7.
59. Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1036–44.
60. Lindqvist M, Haglund S, Almer S, *et al.* Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 261–5.
61. Wang L, Pelleymounter L, Weinshilboum R, *et al.* Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenet Genomics* 2010; **20**: 401–5.
62. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans WE. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 6444–9.
63. Wang L, Sullivan W, Toft D, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 555–64.
64. Krynetski EY, Evans WE. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 2000; **61**: 136–46.
65. Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, Schmiegelow K. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; **17**: 65–8.
66. Corominas H, Domènech M, González D, *et al.* Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 2313–7.
67. Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther* 2001; **70**: 183–8.
68. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, *et al.* Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; **126**: 608–14.
69. Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin J-G, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem* 2008; **54**: 1637–47.



70. Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, *et al.* The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999; **9**: 37–42.
71. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuyssere H, Mastain B, *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 1998; **125**: 879–87.
72. Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A, *et al.* Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT\*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT\*23. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 891–5.
73. Vuchetich JP, Weinshilboum RM, Price RA. Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Genet Epidemiol* 1995; **12**: 1–11.
74. Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, *et al.* Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 434–8.
75. Yan L, Zhang S, Eiff B, *et al.* Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin Pharmacol Ther* 2000; **68**: 210–9.
76. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuyssere H, Sabbagh N, *et al.* Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mutat* 1998; **12**: 177–85.
77. Booth RA, Ansari MT, Loit E, *et al.* Assessment of thiopurine S-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann Intern Med* 2011; **154**: 814–23.
78. Cheung S-T, Allan RN. Mistaken identity: misclassification of TPMT phenotype following blood transfusion. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; **15**: 1245–7.
79. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Zanger U, Aulitzky W, Eichelbaum M. Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology* 2001; **121**: 498–9.
80. Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1987; **41**: 18–25.
81. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990; **336**: 225–9.
82. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics* 2010; **11**: 177–88.
83. Sparrow MP, Hande SA, Friedman S, Cao D, Hanauer SB. Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; **5**: 209–14.
84. Berns A, Rubinfeld S, Rymzo WT, Calabro JJ. Hazard of combining allopurinol and thiopurine. *N Engl J Med* 1972; **286**: 730–1.
85. Seidman EG. Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; **3**(Suppl. 1): S30–8.
86. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, *et al.* Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; **362**: 1383–95.
87. Lemann M, Mary J-Y, Duclos B, *et al.* Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1054–61.
88. O'Brien JJ, Bayless TM, Bayless JA. Use of azathioprine or 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991; **101**: 39–46.
89. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; **70**: 439–44.
90. D'Haens GR, Fedorak R, Lemann M, *et al.* Endpoints for clinical trials evaluating disease modification and structural damage in adults with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; **15**: 1599–604.
91. Treton X, Bouhnik Y, Mary J-Y, *et al.* Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; **7**: 80–5.
92. O'Donoghue DP, Dawson AM, Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. Double-blind withdrawal trial of azathioprine as maintenance treatment for Crohn's disease. *Lancet* 1978; **2**: 955–7.
93. Lemann M, Mary J-Y, Colombel J-F, *et al.* A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 2005; **128**: 1812–8.
94. Jharap B, Seinen ML, de Boer NKH, *et al.* Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 1541–9.
95. Reinisch W, Angelberger S, Petritsch W, *et al.* Azathioprine versus mesalazine for prevention of postoperative clinical recurrence in patients with Crohn's disease with endoscopic recurrence: efficacy and safety results of a randomised, double-blind, double-dummy, multicentre trial. *Gut* 2010; **59**: 752–9.
96. Ardizzone S, Maconi G, Sampietro GM, *et al.* Azathioprine and mesalazine for prevention of relapse after conservative surgery for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; **127**: 730–40.
97. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996; **39**: 401–6.
98. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, *et al.* Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; **118**: 705–13.
99. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; **48**: 642–6.
100. Gupta P, Gokhale R, Kirschner BS. 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; **33**: 450–4.
101. Wright S, Sanders DS, Lobo AJ, Lennard L. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; **53**: 1123–8.
102. Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, Bayless TM. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; **2**: 410–7.
103. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2006; **130**: 1047–53.
104. Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW, *et al.* 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin Chem* 2007; **53**: 1306–14.
105. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, *et al.* Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **28**: 973–83.
106. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, *et al.* Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine

- ine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; **49**: 665–70.
107. Qasim A, Buckley M, O' Morain CA. Thiopurine metabolites and the role of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; **51**: 141; author reply 141–2.
  108. González-Lama Y, Bermejo F, López-Sanromán A, *et al.* Thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolite concentrations do not predict clinical outcome in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 544–54.
  109. Dewit O, Starkel P, Roblin X. Thiopurine metabolism monitoring: implications in inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest* 2010; **40**: 1037–47.
  110. Miheller P, Lakatos PL. Thiopurines in Crohn's disease, is there something new? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; **6**: 1505–14.
  111. Ansari A, Patel N, Sanderson J, O'Donohue J, Duley JA, Florin THJ. Low-dose azathioprine or mercaptopurine in combination with allopurinol can bypass many adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 640–7.
  112. Ansari A, Elliott T, Baburajan B, *et al.* Long term outcome of using allopurinol co-therapy as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; **28**: 734–41.
  113. Rahhal RM, Bishop WP. Initial clinical experience with allopurinol-thiopurine combination therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: 1678–82.
  114. van Bodegraven AA, Mulder CJJ. Indications for 5-aminosalicylate in inflammatory bowel disease: is the body of evidence complete? *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 6115–23.
  115. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1995; **39**: 456–9.
  116. Hande S, Wilson-Rich N, Bousvaros A, *et al.* 5-aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 251–7.
  117. de Boer NKH, Wong DR, Jharap B, *et al.* Dose-dependent influence of 5-aminosalicylates on thiopurine metabolism. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 2747–53.
  118. de Graaf P, de Boer NKH, Wong DR, *et al.* Influence of 5-aminosalicylic acid on 6-thioguanosine phosphate metabolite levels: a prospective study in patients under steady thiopurine therapy. *Br J Pharmacol* 2010; **160**: 1083–91.
  119. Xin H, Fischer C, Schwab M, Klotz U. Effects of aminosaliclates on thiopurine S-methyltransferase activity: an ex vivo study in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **21**: 1105–9.
  120. Dilger K, Schaeffeler E, Lukas M, *et al.* Monitoring of thiopurine methyltransferase activity in postsurgical patients with Crohn's disease during 1 year of treatment with azathioprine or mesalazine. *Ther Drug Monit* 2007; **29**: 1–5.
  121. Andrews JM, Travis SPL, Gibson PR, Gasche C. Systematic review: does concurrent therapy with 5-ASA and immunomodulators in inflammatory bowel disease improve outcomes? *Aliment Pharmacol Ther* 2009; **29**: 459–69.
  122. Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM, Bessard G, Bonaz B. Drug interaction between infliximab and azathioprine in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; **18**: 917–25.
  123. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; **34**: 1081–5.
  124. Bergan S, Bentdal O, Södal G, Brun A, Rugstad HE, Stokke O. Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. *Ther Drug Monit* 1997; **19**: 502–9.
  125. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med* 1989; **111**: 641–9.
  126. Kirschner BS. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; **115**: 813–21.
  127. Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 1783–800.
  128. Gardiner SJ, Gearry RB, Barclay ML, Begg EJ. Two cases of thiopurine methyltransferase (TPMT) deficiency—a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 2006; **62**: 473–6.
  129. Bacon BR, Treuhaft WH, Goodman AM. Azathioprine-induced pancytopenia. Occurrence in two patients with connective-tissue diseases. *Arch Intern Med* 1981; **141**: 223–6.
  130. Lawson DH, Lovatt GE, Gurton CS, Hennings RC. Adverse effects of azathioprine. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev* 1984; **3**: 161–71.
  131. Jeurissen ME, Boerbooms AM, van de Putte LB. Pancytopenia related to azathioprine in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; **47**: 503–5.
  132. Burke DA, Dixon MF, Axon AT. Ulcerative colitis: prolonged remission following azathioprine-induced pancytopenia. *J Clin Gastroenterol* 1989; **11**: 327–30.
  133. Gilissen LPL, Derijks LJJ, Verhoeven HMJH, *et al.* Pancytopenia due to high 6-methylmercaptopurine levels in a 6-mercaptopurine treated patient with Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2007; **39**: 182–6.
  134. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, *et al.* Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 2001–8.
  135. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, *et al.* Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 2293–301.
  136. Schütz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M. Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; **34**: 199–205.
  137. Roblin X, Peyrin-Biroulet L, Phelip JM, Nancey S, Flourie B. 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10<sup>8</sup> erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 3115–22.
  138. Zelinkova Z, Derijks LJJ, Stokkers PCF, *et al.* Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 44–9.
  139. Campbell S, Kingstone K, Ghosh S. Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients maintained on low-dose azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; **16**: 389–98.
  140. Hartford C, Vasquez E, Schwab M, *et al.* Differential effects of targeted disruption of thiopurine methyltransferase

- on mercaptopurine and thioguanine pharmacodynamics. *Cancer Res* 2007; **67**: 4965–72.
141. Dewit O, Moreels T, Baert F, et al. Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin Biochem* 2011; **44**: 1062–6.
142. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, et al. Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2000; **118**: 1025–30.
143. Meggitt SJ, Gray JC, Reynolds NJ. Azathioprine dosed by thiopurine methyltransferase activity for moderate-to-severe atopic eczema: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; **367**: 839–46.
144. Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, et al. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 2003; **52**: 140–2.
145. Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, Schmiegelow K. Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr* 1998; **87**: 108–11.
146. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 1991; **119**: 985–9.
147. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1518–27.
148. de Jong DJ, Derijks LJJ, Naber AHJ, Hooymans PM, Mulder CJJ. Safety of thiopurines in the treatment of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003; **239**: 69–72.
149. Goldstein E, Marion J, Wheeler S, Present D. 6-Mercaptopurine (6-MP): does it increase or decrease the risks of colon cancer in Crohn's disease (CD)? *Gastroenterology* 1998; **114**(Suppl. 1): A986.
150. Gold DM, Levine JJ, Weinstein TA, Kessler B, Pettei MJ. Prolonged medical therapy for severe pediatric ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1995; **90**: 732–5.
151. Bastida G, Nos P, Aguas M, et al. Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; **22**: 775–82.
152. Gisbert JP, Luna M, González-Lama Y, et al. Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**: 1106–14.
153. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**: 331–42.
154. Bermejo F, López-Sanromán A, Algaba A, et al. Mercaptopurine rescue after azathioprine-induced liver injury in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **31**: 120–4.
155. Gilissen LPL, Derijks LJJ, Bos LP, et al. Some cases demonstrating the clinical usefulness of therapeutic drug monitoring in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; **16**: 705–10.
156. Nygaard U, Toft N, Schmiegelow K. Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **75**: 274–81.
157. Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, Weinshilboum RM. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 1992; **2**: 148–59.
158. Goldenberg BA, Rawsthorne P, Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 1744–8.
159. Armstrong VW, Shipkova M, von Ahnen N, Oellerich M. Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther Drug Monit* 2004; **26**: 220–6.
160. Leong RW, Gearry RB, Sparrow MP. Thiopurine hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: the role for adding allopurinol. *Expert Opin Drug Saf* 2008; **7**: 607–16.
161. Gearry RB, Day AS, Barclay ML, Leong RW, Sparrow MP. Azathioprine and allopurinol: a two-edged interaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; **25**: 653–5.
162. Shih DQ, Nguyen M, Ibanez P, Kwan LY, Targan SR, Vasiliauskas EA. W1206 split-dose administration of 6-mercaptopurine/azathioprine: a effective novel strategy for IBD patients with preferential 6mmp metabolism. *Gastroenterology* 2009; **116**: A677–8.
163. Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, Almer SHC. Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; **29**: 654–61.
164. Naber AH, Van Haelst U, Yap SH. Nodular regenerative hyperplasia of the liver: an important cause of portal hypertension in non-cirrhotic patients. *J Hepatol* 1991; **12**: 94–9.
165. Russmann S, Zimmermann A, Krähenbühl S, Kern B, Reichen J. Venooclusive disease, nodular regenerative hyperplasia and hepatocellular carcinoma after azathioprine treatment in a patient with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; **13**: 287–90.
166. Daniel F, Cadranet J-F, Seksik P, et al. Azathioprine induced nodular regenerative hyperplasia in IBD patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; **29**: 600–3.
167. Seiderer J, Zech CJ, Diebold J, et al. Nodular regenerative hyperplasia: a reversible entity associated with azathioprine therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; **18**: 553–5.
168. Vernier-Massouille G, Cosnes J, Lemann M, et al. Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut* 2007; **56**: 1404–9.
169. Seksik P, Mary J-Y, Beaugerie L, et al. Incidence of nodular regenerative hyperplasia in inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine. *Inflamm Bowel Dis* 2011; **17**: 565–72.
170. Seiderer J, Zech CJ, Reinisch W, et al. A multicenter assessment of liver toxicity by MRI and biopsy in IBD patients on 6-thioguanine. *J Hepatol* 2005; **43**: 303–9.
171. Zech CJ, Seiderer J, Reinisch W, et al. Thioguanin-induced nodular regenerative hyperplasia of the liver-ROC analysis of different MR techniques. *Eur Radiol* 2007; **17**: 1898–905.
172. Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; **11**: 826–33.
173. de Boer NKH, Mulder CJJ, van Bodegraven AA. Myelotoxicity and hepatotoxicity during azathioprine therapy. *Neth J Med* 2005; **63**: 444–6.
174. Buster EHCJ, van Vuuren HJ, Zonder van PE, Metselaar HJ, Tilanus HW, de Man RA. Thiopurine-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphism in a liver transplant recipient developing nodular regenerative hyperplasia on low-dose azathioprine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; **20**: 68–72.
175. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, et al. 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; **125**: 298–303.



176. Tanis AA. Azathioprine in inflammatory bowel disease, a safe alternative? *Mediators Inflamm* 1998; 7: 141–4.
177. Haber CJ, Meltzer SJ, Present DH, Korlitz BI. Nature and course of pancreatitis caused by 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1986; 91: 982–6.
178. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50: 485–9.
179. Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, et al. An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 181–9.
180. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1058–63.
181. Bonaz B, Boitard J, Marteau P, et al. Thioguanine in patients with Crohn's disease intolerant or resistant to azathioprine/mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 401–8.
182. Herrlinger KR, Schwab M, Fellermann K, Stange EF. 6-thioguanine-buried alive? *Gastroenterology* 2004; 126: 940–1; author reply 941–2.
183. Domènech E, Nos P, Papo M, López-San Román A, García-Planella E, Gasull MA. 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease and previous digestive intolerance of azathioprine. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 52–5.
184. Bowen DG, Selby WS. Use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease previously intolerant of azathioprine. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1810–3.
185. Boulton-Jones JR, Pritchard K, Mahmoud AA. The use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease after failure of azathioprine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1561–5.
186. McGovern DPB, Travis SPL, Duley J, Shobowale-Bakre EM, Dalton HR. Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology* 2002; 122: 838–9.
187. Holmes SL, Turner BM, Hirschhorn K. Human inosine triphosphatase: catalytic properties and population studies. *Clin Chim Acta* 1979; 97: 143–53.
188. Lin S, McLennan AG, Ying K, et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphatase pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 18695–701.
189. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002; 111: 360–7.
190. Marsh S, King CR, Ahluwalia R, McLeod HL. Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *J Hum Genet* 2004; 49: 579–81.
191. Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, von Ahsen N. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem* 2006; 52: 240–7.
192. von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, et al. Association of inosine triphosphatase 94C>A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin Chem* 2005; 51: 2282–8.
193. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, et al. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 85: 164–72.
194. Stocco G, Crews KR, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9: 23–37.
195. Allorge D, Hamdan R, Broly F, Libersa C, Colombel J-F. ITPA genotyping test does not improve detection of Crohn's disease patients at risk of azathioprine/6-mercaptopurine induced myelosuppression. *Gut* 2005; 54: 565.
196. van Dieren JM, van Vuuren AJ, Kusters JG, Nieuwenhuis EES, Kuipers EJ, van der Woude CJ. ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. *Gut* 2005; 54: 1664.
197. Kurzwski M, Dziewanowski K, Lener A, Drozdziak M. TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 533–40.
198. Gearry RB, Roberts RL, Barclay ML, Kennedy MA. Lack of association between the ITPA 94C>A polymorphism and adverse effects from azathioprine. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 779–81.
199. Van Dieren JM, Hansen BE, Kuipers EJ, Nieuwenhuis EES, Van der Woude CJ. Meta-analysis: Inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphisms and thiopurine toxicity in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 643–52.
200. Hobara N, Watanabe A. Impaired metabolism of azathioprine in carbon tetrachloride-injured rats. *Hepatogastroenterology* 1981; 28: 192–4.
201. Zhang W, Modén O, Mannervik B. Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine. *Chem Biol Interact* 2010; 186: 110–7.
202. Stocco G, Martelossi S, Barabino A, et al. Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 57–64.
203. Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 7–32.
204. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, et al. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 560–9.
205. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 87–99.
206. Huh K, Yamamoto I, Gohda E, Iwata H. Tissue distribution and characteristics of xanthine oxidase and allopurinol oxidizing enzyme. *Jpn J Pharmacol* 1976; 26: 719–24.
207. Ansari A, Aslam Z, De Sica A, et al. Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 749–57.
208. Serre-Debeauvais F, Bayle F, Amirou M, et al. Hematotoxicity caused by azathioprine genetically determined and aggravated by xanthine oxidase deficiency in a patient following renal transplantation. *Presse Med* 1995; 24: 987–8.
209. Relling MV, Lin JS, Ayers GD, Evans WE. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 643–58.
210. Kudo M, Moteki T, Sasaki T, et al. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 243–51.
211. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, et al. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 517–28.
212. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M, et al. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 375–84.

213. Schwarz G. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 2792–810.
214. Krenitsky TA, Neil SM, Elion GB, Hitchings GH. A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1972; **150**: 585–99.
215. Clarke DA, Elion GB, Hitchings GH, Stock CC. Structure-activity relationships among purines related to 6-mercaptopurine. *Cancer Res* 1958; **18**: 445–56.
216. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics* 2001; **1**: 189–201.
217. Karas-Kuzelicki N, Milek M, Mlinaric-Rascan I. MTHFR and TYMS genotypes influence TPMT activity and its differential modulation in males and females. *Clin Biochem* 2010; **43**: 37–42.
218. Dervieux T, Hancock ML, Pui C-H, *et al.* Antagonism by methotrexate on mercaptopurine disposition in lymphoblasts during up-front treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2003; **73**: 506–16.
219. Brouwer C, De Abreu RA, Keizer-Garritsen JJ, *et al.* Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: biochemical and molecular biological aspects. *Eur J Cancer* 2005; **41**: 613–23.
220. Sampath J, Adachi M, Hatse S, *et al.* Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 2002; **4**: E14.
221. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, *et al.* Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res* 2008; **68**: 4983–9.
222. Janke D, Mehralivand S, Strand D, *et al.* 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. *Hum Mutat* 2008; **29**: 659–69.
223. Ban H, Andoh A, Imaeda H, *et al.* The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010; **45**: 1014–21.
224. FDA. Summary of Product Characteristics: Imuran® [Internet]. Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/016324s034s035lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/016324s034s035lbl.pdf). Accessed July 25, 2011.
225. Roblin X, Oussalah A, Chevaux J-B, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts. *Inflamm Bowel Dis* 2011 [Epub ahead of print].
226. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **89**: 387–91.
227. Lesko LJ. The critical path of warfarin dosing: finding an optimal dosing strategy using pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**: 301–3.
228. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, *et al.* Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 1376–81.
229. Achkar J-P, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D, Lashner B. Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; **10**: 339–45.
230. Andoh A, Tsujikawa T, Ban H, *et al.* Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; **23**: 1373–7.
231. Belaiche J, Desager JP, Horsmans Y, Louis E. Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2001; **36**: 71–6.
232. Kwan LY, Devlin SM, Mirocha JM, Papadakis KA. Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008; **40**: 425–32.
233. Erdmann GR, France LA, Bostrom BC, Canafax DM. A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy. *Biomed Chromatogr* 1990; **4**: 47–51.
234. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr* 1992; **583**: 83–90.
235. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. *Clin Chem* 2003; **49**: 260–8.

## Letters to the Editors

W. El-Matary<sup>\*,†</sup>

<sup>\*</sup>Section of Pediatric Gastroenterology,  
Department of Pediatrics, Faculty of  
Medicine University of Manitoba,  
Winnipeg, Canada.

<sup>†</sup>King Saud University, Riyadh,  
Saudi Arabia.

E-mail: welmatary@hsc.mb.ca

doi:10.1111/j.1365-2036.2012.04995.x

### Letter: thiopurine blood monitoring for patients with inflammatory bowel disease

SIRS, I read with great interest, the article by Chouchana and colleagues.<sup>1</sup> The authors summarised the current evidence examining the efficacy and dose and non-dose-related toxicity of thiopurine in patients with inflammatory bowel disease (IBD). They suggested an evidence-based algorithm to help with guiding practitioners in using thiopurine for patients with IBD. They recommended monitoring of blood count regularly during therapy as myelotoxicity can happen at any time during therapy beginning from 2 weeks after introduction of thiopurine.<sup>2</sup> In the algorithm provided, the authors recommended regular blood testing for blood cell counts and liver tests. Unfortunately, the authors did not provide any recommendations regarding how frequently the blood testing should be performed.

Regular blood testing can be an obstacle in initiating and maintain thiopurine especially in children with IBD. Currently, there is no consensus regarding the frequency of blood testing for thiopurine monitoring. Several practitioners would do blood testing every week for the first 4 weeks after initiating thiopurine therapy, followed by fortnight blood testing for 1 month, then monthly blood testing for a variable duration, and then 3-month blood testing, until thiopurine is stopped. Although there is no good evidence to suggest clear benefits of thiopurine therapy after 18 months of maintaining IBD remission, it is very common for patients with IBD to be on thiopurine for 5 years.<sup>3</sup> Continuing blood monitoring for such a long duration can create major anxiety especially in children with IBD. Large well-designed studies are needed to address this important issue.

### ACKNOWLEDGEMENT

*Declaration of personal and funding interests:* None.

### REFERENCES

1. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 15–36.
2. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathiopurine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; **34**: 1081–5.
3. French H, Dalzell AM, Srinivasan R, El-Matary W. Relapse rate following azathioprine withdrawal in maintaining remission for Crohn's disease: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 1929–36.

*AP&T invited commentary and correspondence columns are restricted to letters discussing papers that have been published in the journal. A letter must have a maximum of 300 words, may contain one table or figure, and should have no more than 10 references. It should be submitted electronically to the Editors via <http://mc.manuscriptcentral.com/apt>.*

L. Chouchana<sup>\*,†,‡</sup>,  
C. Narjoz<sup>\*,†,‡</sup>, P. Beaune<sup>\*,†,‡</sup>,  
M.-A. Lorient<sup>\*,†,‡</sup> & X. Roblin<sup>§</sup>

<sup>\*</sup>Assistance publique-Hôpitaux de  
Paris, Hôpital Européen Georges  
Pompidou, Biochimie,  
Pharmacogénétique et Oncologie  
Moléculaire, Paris, France.

<sup>†</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne  
Paris Cité, Paris, France.

<sup>‡</sup>INSERM, UMR-S775, Paris, France.

<sup>§</sup>CHU Saint-Etienne,  
Gastroentérologie, Saint-Etienne,  
France.

E-mail: marie-anne.lorient@egp.aphp.fr

doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05003.x

## Letter: thiopurine blood monitoring for patients with inflammatory bowel disease – authors' reply

SIRS, We read carefully the letter from Dr El-Matary regarding our review on the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease.<sup>1, 2</sup> We agree that performing blood testing remain a matter of debate for the prevention of thiopurine toxicity.

First, neutropenia, strongly linked to high 6-thioguanine nucleotide blood level, is a frequent and serious adverse event of thiopurine therapy, potentially lethal.<sup>3</sup> It frequently occurs in the first months of therapy, starting from 2 weeks, mostly in thiopurine S-methyltransferase deficient patients.<sup>3</sup> However, neutropenia can happen anytime during therapy, until 27 years in long-term follow-up.<sup>3</sup> Moreover, as Connell *et al.* showed, blood count is often normal, 1 month before the occurrence of a moderate or severe leucopenia.<sup>4</sup> Nevertheless, this suggests that performing blood counts in a 3 months basis may have limited efficacy to predict early bone marrow suppression. Actually, early neutropenia probably differs from delayed toxicity, in which a dosage alteration, a therapy change or a deficiency in vitamin B12 or folates can be involved.

Second, hepatotoxicity, probably related to elevated and lasting 6-methylmercaptopurine blood level, is commonly represented as mild, transient or reversible, elevation in serum transaminase.<sup>5</sup> Thiopurine-induced liver injury occurs more frequently within the first months of treatment between, 1.5 and 5 months, although it can also occur after long-term treatment.<sup>6, 7</sup> Thus, despite no consensus, liver tests can be easily added to routine blood count determinations.

A recent meta-analysis did not conclude for clear benefits to maintain thiopurine therapy after 18 months.<sup>8</sup> However, relapse occurs between 14% and 41% for the first subsequent year after therapy cessation.<sup>9, 10</sup> In this meta-analysis, as the authors acknowledged, only two studies with high heterogeneity and poor statistical power were included for the assessment of relapse until 5 years.<sup>8</sup> Finally, stopping an effective and well-tolerated thiopurine therapy is still questionable.

## ACKNOWLEDGEMENT

*Declaration of personal and funding interests:* None.

## REFERENCES

1. El-Matary W. Letter: thiopurine blood monitoring for patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 742.
2. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M-A, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 15–36.
3. Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; **103**: 1783–800.
4. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; **34**: 1081–5.
5. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, *et al.* Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; **118**: 705–13.

6. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2007; **102**: 1518–27.
7. Gisbert JP, Luna M, González-Lama Y, *et al.* Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**: 1106–14.
8. French H, Mark Dalzell A, Srinivasan R, El-Matary W. Relapse rate following azathioprine withdrawal in maintaining remission for Crohn's disease: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 1929–36.
9. Treton X, Bouhnik Y, Mary J-Y, *et al.* Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; **7**: 80–5.
10. O'Donoghue DP, Dawson AM, Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. Double-blind withdrawal trial of azathioprine as maintenance treatment for Crohn's disease. *Lancet* 1978; **2**: 955–7.



## REFERENCES

1. de Boer NKH, Jharap B, Seinen ML, van Bodegraven AA. Letter: thiopurines during pregnancy and intrauterine exposure to metabolites. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 964–5.
2. Connell W, Miller A. Treating inflammatory bowel disease during pregnancy: risks and safety of drug therapy. *Drug Saf* 1999; **21**: 311–23.
3. Gisbert JP. Safety of immunomodulators and biologics for the treatment of inflammatory bowel disease during pregnancy and breast-feeding. *Inflamm Bowel Dis* 2010; **16**: 881–95.
4. Mahadevan U, Kane S. American gastroenterological association institute technical review on the use of gastrointestinal medications in pregnancy. *Gastroenterology* 2006; **131**: 283–311.
5. Mahadevan U. Continuing immunomodulators and biologic medications in pregnant IBD patients – pro. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**: 1439–40.
6. Habal FM, Huang VW. Review article: a decision-making algorithm for the management of pregnancy in the inflammatory bowel disease patient. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 501–15.
7. de Boer NK, Jarbandhan SV, de Graaf P, et al. Azathioprine use during pregnancy: unexpected intrauterine exposure to metabolites. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**: 1390–2.
8. Saarikoski S, Seppala M. Immunosuppression during pregnancy: transmission of azathioprine and its metabolites from the mother to the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1973; **115**: 110–6.
9. de Boer NK, Van Elburg RM, Wilhelm AJ, et al. 6-Thioguanine for Crohn's disease during pregnancy: thiopurine metabolite measurements in both mother and child. *Scand J Gastroenterol* 2005; **40**: 1374–7.
10. de Boer NK, van Bodegraven AA, Jharap B, et al. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; **4**: 686–94.

G. Stocco\*, S. De Iudicibus<sup>\*,†</sup>,  
E. Cuzzoni\*, G. Decorti\*,  
S. Martellosi<sup>‡</sup>  
& A. Ventura<sup>†,‡</sup>

\*Department of Life Sciences,  
University of Trieste, Trieste, Italy.

<sup>†</sup>Department of Medical, Surgical and  
Health Sciences, University of Trieste,  
Trieste, Italy.

<sup>‡</sup>Institute for Maternal and Child  
Health, I.R.C.C.S. "Burlo Garofolo",  
Trieste, Italy.

E-mail: stoccog@units.it

doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05027.x

## Letter: TPMT activity and age in IBD patients

SIRS, We read the review by Chouchana *et al.*<sup>1</sup> with interest. We think this is a comprehensive and well-written update on the topic of thiopurine pharmacogenetics for IBD, particularly interesting because of recent prospective studies that were unable to find an association between thiopurine metabolites concentration and clinical response in IBD, which should be put in the perspective of current literature.

However, we underline that the statement that thiopurine-S-methyl-transferase (TPMT) activity does not seem to be altered in a relevant manner by age may not be perfectly accurate, particularly for children with IBD. Indeed, there are previous reports that young subjects have higher TPMT activity compared to older ones: Serpe *et al.* showed that TPMT activity is significantly higher in wild-type children than wild-type adults and, in particular, wild-type infants (0.08–2 years) had a 9% higher TPMT activity than other wild-type groups<sup>2</sup>; McLeod *et al.* reported similarly that in newborns TPMT activity and TPMT protein concentration in erythrocytes are 50% higher than in healthy adults.<sup>3</sup> Results consistent with these observations have been reported by other authors.<sup>4, 5</sup>

Moreover, a recent study showed that IBD patients 6 years of age or younger treated with thiopurines had an 85% increase in probability of response if taking a dose >3.0 mg/kg/day, that is considered the upper limit for the safe dose of this medication in the general adult population, compared to a dose of 2–3 mg/kg/day. These data support the view that closely monitored dose escalation beyond

the standard dosing range, including evaluation of thiopurine metabolites, may be effective and well tolerated<sup>6</sup> in very young patients. Therefore, we think that prospective studies evaluating the possibility of treating young children with IBD with higher doses of thiopurines, in the perspective of their higher TPMT activity, while monitoring thiopurine metabolite concentrations may be of importance to improve treatment of this particularly relevant population of patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

*Declaration of personal interests:* Dr Gabriele Stocco is supported by Associazione Genitori Malati Emopatici Neoplastici Friuli Venezia Giulia. Dr Sara De Iudicibus is supported by Associazione Italiana per i Bambini ed i Giovani con Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali. *Declaration of funding interests:* None.

## REFERENCES

1. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 15–36.
2. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, *et al.* Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics* 2009; **10**: 1753–65.
3. McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 1995; **5**: 281–6.
4. Pettersson B, Almer S, Albertioni F, Soderhall S, Peterson C. Differences between children and adults in thiopurine methyltransferase activity and metabolite formation during thiopurine therapy: possible role of concomitant methotrexate. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 351–8.
5. Ferroni MA, Marchi G, Sansone E, *et al.* Variability in the rate of 6-mercaptopurine methylation in the erythrocytes, liver and kidney in an Italian population. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; **51**: 23–9.
6. Grossman AB, Noble AJ, Mamula P, Baldassano RN. Increased dosing requirements for 6-mercaptopurine and azathioprine in inflammatory bowel disease patients six years and younger. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: 750–5.

L. Chouchana<sup>\*,†,‡</sup>,  
C. Narjoz<sup>\*,†,‡</sup>, P. Beaune<sup>\*,†,‡</sup>,  
M.-A. Lorient<sup>\*,†,‡</sup> & X. Roblin<sup>§</sup>

<sup>\*</sup>Assistance publique-Hôpitaux de  
Paris, Hôpital Européen Georges  
Pompidou, Biochimie,  
Pharmacogénétique et Oncologie  
Moléculaire, Paris, France.

<sup>†</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne  
Paris Cité, Paris, France.

<sup>‡</sup>INSERM UMR-S775, Paris, France.

<sup>§</sup>CHU Saint-Etienne,  
Gastroentérologie, Saint-Etienne,  
France.

E-mail: marie-anne.lorient@egp.aphp.fr

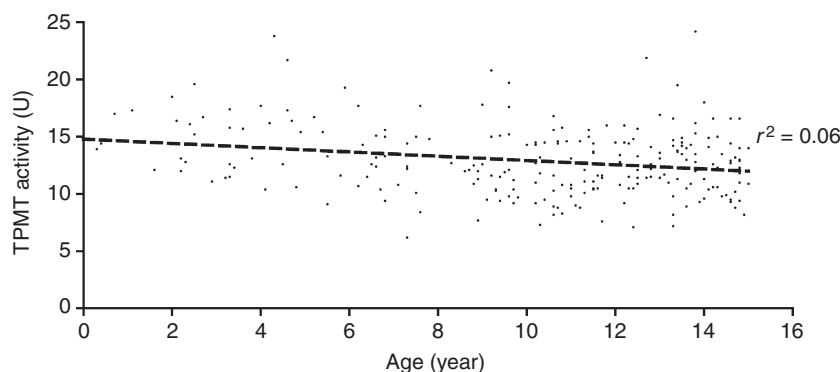
doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05052.x

## Letter: TPMT activity and age in IBD patients – authors' reply

SIRS, We thank Stocco *et al.* for their letter about the influence of age on thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity, with respect to our review on thiopurine pharmacogenetics for inflammatory bowel disease (IBD).<sup>1, 2</sup> Influence of age has been shown for many drug-metabolising enzymes.<sup>3</sup> Several confounding factors such as treatment (by thiopurine or methotrexate) or analytical variations can affect TPMT activity measurement.<sup>4, 5</sup>

Although some articles conclude that there is a higher TPMT activity in children, Ganiere-Monteil *et al.*, in a population of 147 children and 304 healthy adult blood donors, showed a slight, but significantly, lower TPMT activity in children than in adults ( $18.62 \pm 4.14$  vs.  $19.34 \pm 4.09$  nmol/h/mL;  $P = 0.033$ ).<sup>6</sup> However, this minor difference is almost certainly not clinically relevant during thiopurine therapy.

Globally, in two large-scale cohort studies, TPMT activity did not appear to be modified by age.<sup>7, 8</sup> In addition, based on our own 8-year laboratory experience ( $n = 3771$  patients) in a French University hospital, we measured TPMT activity



**Figure 1 |** Impact of the age on thiopurine S-methyltransferase (TPMT) activity in 244 patients under 15 years of age (unpublished personal data from L. Chouchana, C. Narjoz, M.-A. Lorient and P. Beaune).

in 244 wild-type children (median: 11.0 years; range: 0.3–15). We did not find any impact of age on TPMT activity ( $r^2 = 0.06$ ) (Figure 1; unpublished personal data from L. Chouchana, C. Narjoz, M.-A. Lorient and P. Beaune).

It is a known fact that higher doses of azathioprine (2.5 mg/kg/day) are more effective than lower doses (1.0–2.0 mg/kg/day) in IBD.<sup>9</sup> Interestingly, Grossman *et al.* showed that 6-year-old, or younger, IBD patients might require azathioprine doses >3.0 mg/kg/day.<sup>10</sup> However, many pharmacokinetic parameters (e.g. absorption, hepatic clearance) or metabolic enzymes, probably more significant than TPMT activity, could account for this difference between adults and children.

To conclude, we think that even if it exists, TPMT activity difference between children and adults is very small and clinically irrelevant in terms of any effect on thiopurine response, considering the inter-individual variability in thiopurine metabolism and the lack of a standardised method to assay TPMT activity.

## ACKNOWLEDGEMENT

*Declaration of personal and funding interests:* None.

## REFERENCES

1. Stocco G, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Decorti G, Martellosi S, Ventura A. Letter: TPMT activity and age in IBD patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 966–7.
2. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M-A, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; **35**: 15–36.
3. de Wildt SN. Profound changes in drug metabolism enzymes and possible effects on drug therapy in neonates and children. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011; **7**: 935–48.
4. Pettersson B, Almer S, Albertioni F, Söderhäll S, Peterson C. Differences between children and adults in thiopurine methyltransferase activity and metabolite formation during thiopurine therapy: possible role of concomitant methotrexate. *Ther Drug Monit* 2002; **24**: 351–8.
5. Loit E, Tricco AC, Tsouros S, Sears M, Ansari MT, Booth RA. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin Biochem* 2011; **44**: 751–7.
6. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, *et al.* Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **60**: 89–96.

7. Chouchana L, Roche D, Narjoz C, *et al.* Screening of TPMT deficiency by phenotyping and genotyping: a retrospective study among 1,500 IBD patients in France. *Gastroenterology* 2011; **140**: S281–2.
8. Gisbert JP, Gomollón F, Cara C, *et al.* Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 1262–9.
9. Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD000067.
10. Grossman AB, Noble AJ, Mamula P, Baldassano RN. Increased dosing requirements for 6-mercaptopurine and azathioprine in inflammatory bowel disease patients six years and younger. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: 750–5.

## Annexe 4 – revue de la littérature dans La Lettre du Pharmacologue

---

Revue de la littérature sur les thiopurines publiée dans La Lettre du Pharmacologue.

« Pharmacogénétique des thiopurines »

Chouchana L, Lorient MA. *La Lettre du Pharmacologue*. 2013;27(3):72-5.

# Pharmacogénétique des thiopurines

## Pharmacogenetics of thiopurines

L. Chouchana\*, M.A. Lorient\*



L. Chouchana

Les thiopurines – azathioprine et 6-mercaptopurine (6-MP) – sont des médicaments immuno-suppresseurs et cytotoxiques utilisés dans de multiples indications (maladie de Crohn, lupus, transplantation d'organe, leucémie aiguë lymphoblastique, etc.). Ces molécules étant des prodrogues, leur efficacité thérapeutique dépend d'une biotransformation enzymatique complexe en métabolites pharmacologiquement actifs. La variabilité observée dans la réponse clinique aux thiopurines (efficacité, toxicités, résistance) est majoritairement due à la variabilité interindividuelle de leur métabolisme, en particulier au niveau de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), qui module la production des métabolites actifs. L'optimisation thérapeutique des patients traités par thiopurines repose sur l'exploration du métabolisme des thiopurines par :

- la mesure de l'activité TPMT ;
- et le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) avec le dosage des métabolites – 6-thioguanine nucléotides (6-TGN) et 6-méthylmercaptopurine ribonucléotides (6-MMP[R]).

## Métabolisme des thiopurines

L'azathioprine est rapidement transformée en 6-MP, en partie par des glutathion S-transférases (GST), puis est ensuite métabolisée par 3 voies enzymatiques compétitives (*figure 1*) [1] :

- la xanthine oxydase (XO), conduisant à l'acide thiourique, métabolite inactif excrété dans les urines ;
- la TPMT, méthylant la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) ;
- l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), conduisant, après plusieurs transformations enzymatiques passant par la 6-thioinosine monophosphate (6-TIMP), à la formation des métabolites actifs, les 6-TGN. Après intervention de la TPMT, cette voie aboutit également à la formation de ribonucléotides méthylés mono-, di-, puis triphosphatés, désignés collectivement sous le terme de 6-méthylmercaptopurine ribonucléotides (6-MMP[R]) [1].

L'incorporation des 6-TGN à l'ADN, associée à l'inhibition de la protéine Rac1 provoquée plus particulièrement par le thionucléotide triphosphaté – 6-thioguanine triphosphate (6-TGTP) –, induit une apoptose cellulaire, notamment des leucocytes, à l'origine de la cytotoxicité et de l'immunosuppression. De plus, les 6-MMP[R] sont de puissants inhibiteurs de la synthèse de novo des purines (1).

## Thiopurine S-méthyltransférase

Enzyme cytosolique dont le substrat endogène est inconnu à l'heure actuelle, la TPMT catalyse la S-méthylation de cycles aromatiques comme la 6-MP, en utilisant la S-adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle.

\* Assistance publique-hôpitaux de Paris, hôpital européen Georges-Pompidou; biochimie, pharmacogénétique et oncologie moléculaire, Paris; université Paris-Descartes, Sorbonne Paris-Cité; Inserm UMR-S 775, Paris.

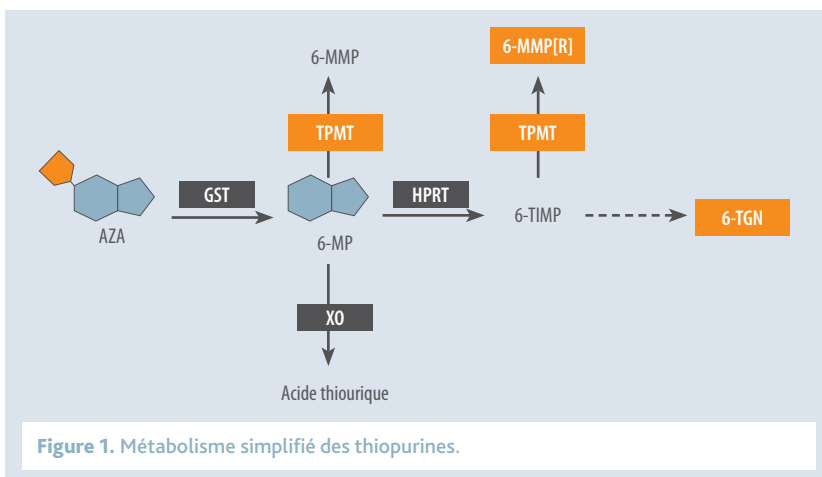


Figure 1. Métabolisme simplifié des thiopurines.

## Points forts<sup>++</sup>

- » La variabilité observée dans la réponse clinique aux thiopurines (azathioprine et 6-mercaptopurine) est majoritairement due aux variations interindividuelles de leur métabolisme, en particulier au niveau de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) qui module la production des métabolites actifs, les 6-TGN et les dérivés méthylés 6-MMP[R].
- » La mesure de l'activité TPMT ou sa prédiction par le génotype TPMT avant le début du traitement permet de dépister les sujets déficients et d'adapter la posologie initiale en thiopurine.
- » Le suivi thérapeutique pharmacologique, fondé sur le dosage intraérythrocytaire des 6-TGN et 6-MMP[R], est indiqué en cas de toxicité hématologique ou hépatique, de résistance au traitement, de suspicion de non-observance ou pour valider une adaptation posologique chez les sujets déficients en TPMT.

### ◆ Polymorphisme de l'activité TPMT

L'activité catalytique de la TPMT est variable et est associée à un polymorphisme du gène qui code pour cette enzyme, dont le caractère héréditaire a été démontré par des études de familles dans les années 1980 (2). Ainsi, si 89 % des individus ont une activité élevée/normale, environ 11 % présentent un déficit partiel d'activité (activité intermédiaire) et sont porteurs de 1 allèle muté (hétérozygote), et moins de 1 % ont un déficit complet d'activité et sont porteurs de 2 allèles mutés (homozygote muté ou hétérozygote composite) [figure 2] (2).

### ◆ Le gène de la TPMT

Le gène TPMT, localisé sur le chromosome 6 (6p22.3), comprend 10 exons – dont 8 sont codants – et 9 introns (3). L'allèle sauvage est appelé TPMT\*1.

À ce jour, une trentaine de variants alléliques ont été identifiés (4) ; les plus fréquents, qui représentent 95 % des allèles mutés, sont TPMT\*2, \*3A, \*3B et \*3C, porteurs de mutations faux-sens localisées sur les exons 5, 7 et 10 (figure 2) [3, 5]. La présence d'une de ces mutations est associée à un déficit d'activité. Par ailleurs, 10 à 15 % des individus ont une activité très élevée, probablement en relation avec un polymorphisme au niveau du promoteur du gène de la TPMT (6, 7).

### ◆ Corrélation entre le génotype et le phénotype

De manière générale, il existe une bonne corrélation entre le génotype et le phénotype TPMT sur la base de la détection des 3 mutations principales (exons 5, 7 et 10) pour la recherche du déficit d'activité TPMT. Les discordances génotype-phénotype sont principa-

## Mots-clés

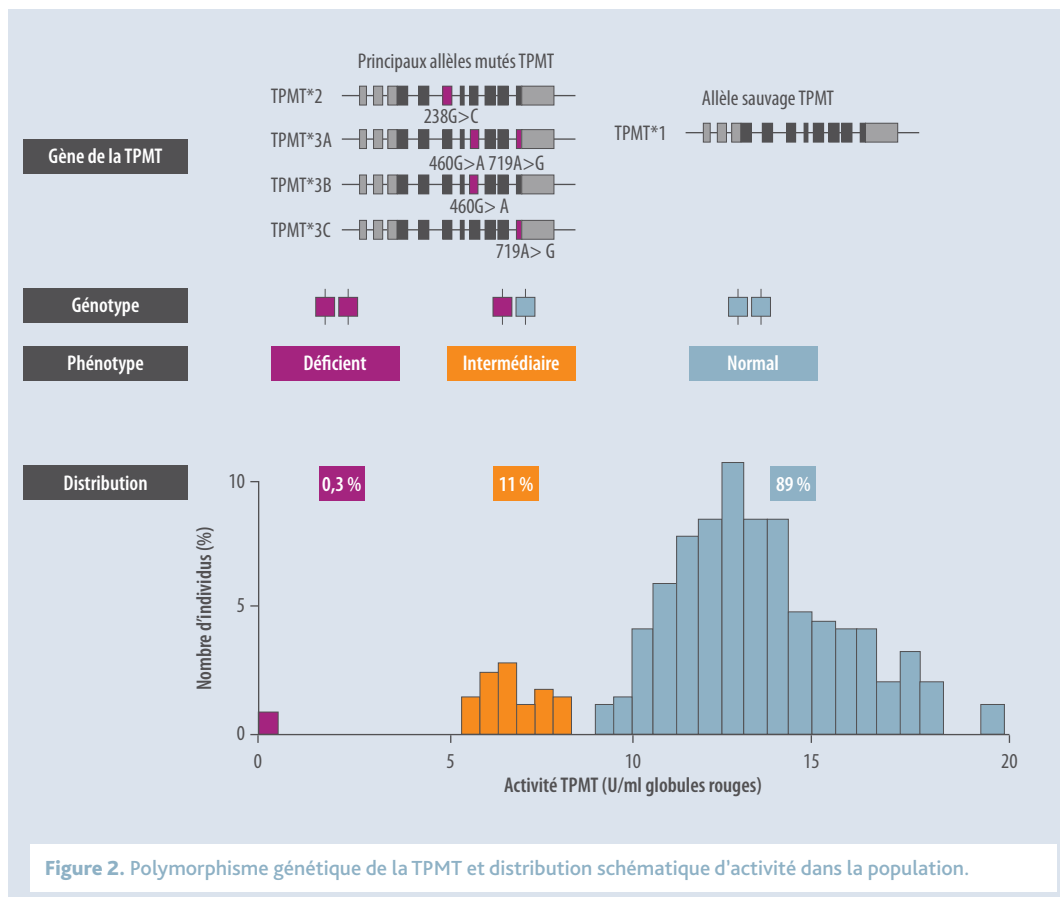
Thiopurine  
TPMT  
6-TGN  
Optimisation  
thérapeutique

## Highlights

- » Variability in clinical response to thiopurines is mainly due to inter-individual variations in their metabolism, particularly regarding the TPMT activity, which modulates the production of active metabolites, 6-TGN and methylated derivatives 6-MMP[R].
- » In patients scheduled to start thiopurine therapy, TPMT phenotype or genotype determination is recommended to screen TPMT-deficient individuals and to help in selecting the initial thiopurine dosage.
- » Therapeutic drug monitoring, i.e. 6-TGN and 6-MMP[R] intra-erythrocyte assay, is useful in case of hematological or hepatic toxicity, resistance to treatment, suspicion of uncompliant patient or to confirm a dosage adjustment in TPMT-deficient individuals.

## Keywords

Thiopurine  
TPMT  
6-TGN  
Therapeutic optimization





**Tableau.** Proposition d'adaptation de la posologie initiale de thiopurine en fonction du phénotype ou du génotype TPMT (8).

Phénotype TPMT	Activité normale/élevée	Activité intermédiaire	Activité faible
Génotype TPMT	Homozygote sauvage	Hétérozygote	Homozygote muté
Ajustement posologique	Dose standard	30-70 % de la dose standard	10 % de la dose standard, 3 fois par semaine
Posologie initiale	AZA : 2,0-2,5 mg/kg/j 6-MP : 1,5 mg/kg/j	AZA : 1,0-1,5 mg/kg/j 6-MP : 0,75 mg/kg/j	AZA : 0,2-0,25 mg/kg × 3/sem. 6-MP : préférer un autre traitement

lement dues à des mutations rares, non recherchées a priori (9). Par rapport au génotypage, le phénotypage présente l'avantage de détecter également les individus ayant une activité TPMT très élevée et potentiellement à risque de faible réponse au traitement et de toxicité hépatique (cf. infra).

## Conséquences cliniques du polymorphisme de la TPMT

Schématiquement, chez les sujets présentant un déficit partiel ou complet d'activité TPMT, le métabolisme des thiopurines est dévié vers la voie enzymatique responsable de la production des 6-TGN, qui sont pharmacologiquement actifs mais également responsables de la cytotoxicité. Une concentration sanguine élevée en 6-TGN entraîne leur accumulation dans les tissus hématopoïétiques, à l'origine d'une toxicité hématologique importante – de type leucopénie-neutropénie (dans 10 à 20 % des cas), voire aplasie médullaire (dans 1 à 5 % des cas) – pouvant être létale.

Ainsi, la mesure de l'activité TPMT (phénotypage) ou la détermination du génotype TPMT a priori permet de dépister les patients ayant une activité faible (homozygotes mutés) ou intermédiaire (hétérozygotes) et qui sont respectivement à très haut risque et à risque élevé de développer une toxicité hématologique sévère et précoce, en l'absence d'une réduction posologique (10, 11). Ces patients peuvent être traités de façon satisfaisante par thiopurines en diminuant la posologie initiale en fonction de leur statut TPMT, selon les recommandations du NIH Pharmacogenomics Research Network (*tableau*) [8].

À l'inverse, les individus ayant une activité TPMT très élevée, associée à une faible production de 6-TGN, pourraient être sous-dosés aux posologies standard, ce qui expliquerait en partie certaines résistances aux thiopurines (12). Par ailleurs, un métabolisme préférentiel vers la formation des dérivés méthylés

expose également les patients à de fortes concentrations en 6-MMP[R] pouvant être à l'origine d'une toxicité hépatique, retrouvée chez environ 10 % des patients traités (13).

## Suivi thérapeutique pharmacologique : dosage intraérythrocytaire des métabolites

Au cours du traitement, le STP, fondé sur le dosage intraérythrocytaire des 6-TGN et des 6-MMP[R], permet de suivre la réponse au traitement. L'état d'équilibre des 6-TGN est obtenu en 4 à 5 semaines environ. Même si la corrélation entre les concentrations en 6-TGN et la réponse clinique est encore discutée, le seuil de  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  globules rouges (GR) semble être associé à l'efficacité (13, 14). De même, un ratio 6-MMP[R]/6-TGN inférieur à 20 semble être prédictif d'une réponse thérapeutique. De plus, les patients avec une concentration en 6-MMP[R] supérieure à  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  GR ont un risque 3 fois plus élevé de développer une hépatite (13). Ainsi, a minima, le STP est indiqué dans les cas suivants :

- toxicité hématologique ou hépatique ;
- résistance au traitement ;
- suspicion de non-observance du patient ;
- validation d'une adaptation posologique chez un patient avec une TPMT faible ou intermédiaire.

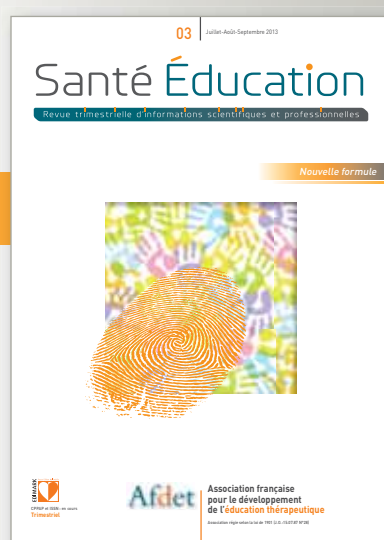
## Conclusion

La pharmacogénétique (génotypage/phénotypage de la TPMT) associée au suivi thérapeutique pharmacologique (dosage des 6-TGN et 6MMP[R]) offre aux cliniciens l'opportunité d'une prise en charge optimisée tant sur le plan de l'efficacité que de la toxicité. ■



## Références bibliographiques

1. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35(1):15-36.
2. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32(5):651-62.
3. Szumlanski C, Ottensmeyer F, Her C et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* 1996;15(1):17-30.
4. Appell ML, Berg J, Duley J et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23(4):242-8.
5. Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, Aarbakke J. Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):183-8.
6. Ansari A, Hassan C, Duley J et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(10):1743-50.
7. Roberts RL, Gearry RB, Bland MV et al. Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18(5):434-8.
8. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(3):387-91.
9. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D et al. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004;14(7):407-17.
10. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1990;336(8709):225-9.
11. Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, Lorient MA. Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? *Clin Chem* 2013;59(7):1023-6.
12. FDA. Summary of Product Characteristics: Imuran®. 2011.
13. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118(4):705-13.
14. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2006;130(4):1047-53.



Publication trimestrielle

EDIMARK éditeur de la publication de l'AFDET

Prochain numéro à paraître en septembre 2013...

**Former, informer !**

**Éducation thérapeutique :**  
**comment vous former et informer vos patients**

Publication à destination de tous les professionnels de santé



**Abonnez-vous au 01 46 67 62 74 / 87**



## Annexe 5 – avis CPP base de données pharmacogénétiques

---

Avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile-de-France II pour l'étude sur la base de données pharmacogénétiques (cf. Article 1).

- Annexe 5 -  
**Comité de Protection des Personnes**  
*« Ile de France II »*

**IRB registration # : 00001072**

**Bureau :**

Présidente : Marie-France MAMZER-BRUNEEL

Vice-Président : Christian HERVE

Secrétaires : Pierre COLONNA, Gérard PELE

Trésorier : Stéphane DONNADIEU

**Membres :**

C. ARDIOT, H. BENECH, J.-L. BRESSON, C. BROISSAND, J.-B. CHARPENTIER, G. CHATELLIER, P. COLONNA, B. DEBAECKER, N. DELSARTE, S. DONNADIEU, J. FAGARD, C. HERVE, L. LEBOUCHER, A. LEVY, M.-F. MAMZER-BRUNEEL, E. MARTINENT, O. PARENT de CURZON, M. PARISOT, G. PELE, G. PEREIRA, R. QUERE, G. QUEVA, C. RAMBAUD, M.-C. REINMUND, M. RUDLER, P. VAN ES

**Secrétariat :** Clément Nencioli

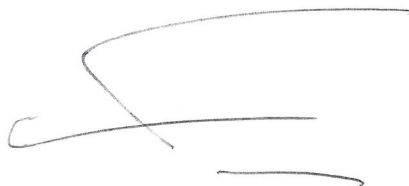
PARIS, le 16 juillet 2013

**Réf. 2013-07-06**

Le Comité a été saisi d'une demande du Pr. Marie-Anne LORIOT, concernant une recherche non interventionnelle, intitulée :

*« Base de données rétrospective sur des patients traités par azathioprine (données biologiques). »*

Ce projet a obtenu un **avis éthique favorable** de la part des membres du CPP Ile de France II, lors de la réunion du **08/07/2013**.



Dr Marie-France MAMZER-BRUNEEL,  
Présidente du CPP IDF II

## Annexe 6 – accord de transfert de matériel biologique LCL

---

---

Accord de transfert de matériel biologique (*material transfer agreement*, MTA) entre l'Université Paris Descartes et Tel-Aviv University pour l'obtention des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (cf. Article 4).

<b>ACCORD DE TRANSFERT DE MATERIEL BIOLOGIQUE</b>
---

**Bénéficiaire :**  
("BENEFICIAIRE")

**Université Paris Descartes**

**Responsable Scientifique du BENEFICIAIRE : LORIOT Marie-Anne**  
("Responsable Scientifique")

**Matériel transmis :**  
("MATERIEL")

Lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL)

**Programme de Recherche :**

Recherche de facteurs prédictifs de la réponse aux thiopurines, médicaments utilisés chez l'homme pour leurs propriétés immunosuppressives.

("ETUDE")

Le BENEFICIAIRE, tant pour son compte que pour celui de ses collaborateurs déclare et s'engage à :

1. Reconnaître que le le MATERIEL a été mis à la disposition de **LORIOT Marie-Anne** ("Responsable Scientifique") du laboratoire UMRS 1147 (ex 775) localisé à la Faculté : Université Paris Descartes (le "LABORATOIRE"), par Monsieur David GURWITZ, responsable du laboratoire de « National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations, Tel-Aviv University »

uniquement dans un but de recherche, pour les besoins de l'ETUDE décrite en annexe 1, et sous sa seule responsabilité à compter de son retrait de Tel-Aviv University et ce jusqu'à la date de son retour éventuel à l'issue de l'ETUDE ou en cas de résiliation anticipée.

2. Reconnaître expressément que le MATERIEL et les informations communiquées par David GURWITZ sont la propriété exclusive de Tel-Aviv University

Le BENEFICIAIRE et le Responsable Scientifique s'engagent à tenir pour confidentielles toutes les informations obtenues dans le cadre de ce transfert et à ne pas publier, divulguer ou utiliser de quelque façon que ce soit, directement ou indirectement ces informations sans accord préalable, exprès et écrit de Monsieur David GURWITZ de de Tel-Aviv University.

Nonobstant ce qui précède, le BENEFICIAIRE et le Responsable Scientifique ne seront pas tenus à une obligation de secret vis-à-vis des informations communiquées par Tel-Aviv University) dans le cadre du présent contrat (autre que le MATERIEL) qui (a) sont connues d'une manière générale au moment de la divulgation ou tombent dans le domaine public sans faute de la part du BENEFICIAIRE et du Responsable Scientifique ; ou (b) sont déjà en possession part du BENEFICIAIRE et du Responsable Scientifique au moment de la divulgation par Tel-Aviv University; ou (c) sont développées de manière indépendante par le BENEFICIAIRE et le Responsable Scientifique ou en son nom sans utilisation des informations fournies par Tel-Aviv University.

Toute publication ou communication de résultats issus de l'utilisation du MATERIEL et/ou mentionnant le MATERIEL, autorisée par David GURWITZ devra mentionner le nom de Tel-Aviv University

3. Disposer des locaux et des équipements nécessaires pour mener l'ETUDE ;  
Avoir reçu toutes autorisations requises à cet effet ;  
Et, plus généralement, se conformer aux lois et règlements en vigueur dans ce domaine, ainsi qu'aux Bonnes Pratiques de Laboratoire.

4. Reconnaître que le MATERIEL lui a été fourni uniquement dans un but de recherche *in vitro* et/ou *in vivo* sur l'animal de laboratoire, et en conséquence de quoi s'interdire toute utilisation autre, conduisant notamment, directement ou indirectement, à une exploitation industrielle ou commerciale.
5. Reconnaître que LE MATERIEL EST DE NATURE EXPERIMENTALE ET VOUS EST FOURNI PAR Tel-Aviv University SANS AUCUNE GARANTIE, EXPRESSE OU TACITE, INCLUANT TOUTE GARANTIE COMMERCIALE OU D'ADEQUATION POUR UNE UTILISATION SPECIFIQUE  

Tel-Aviv University ne garantit pas que l'utilisation du Matériel ne porte pas atteinte aux droits de propriété intellectuelle de tiers.
6. Ce que l'ETUDE soit conduite au sein du LABORATOIRE par le Responsable Scientifique, lui-même ou sous sa responsabilité.
7. Ne pas faire circuler le MATERIEL et les informations communiquées par Tel-Aviv University hors du LABORATOIRE, ni l'utiliser à d'autres fins que celles de l'ETUDE et à ne pas en fournir, même à titre gratuit, à des tiers, y compris à des personnes publiques ou privées avec lesquelles le laboratoire de l'utilisateur pourrait entretenir des liens de dépendance économique et/ou juridique, sans avoir obtenu l'autorisation préalable et écrite de Tel-Aviv University
8. Reconnaître que le MATERIEL doit être utilisé avec les précautions d'usage relatives aux matériels biologiques dont toutes les caractéristiques ne sont pas connues, et en conséquence prendre toutes dispositions pour couvrir tout dommage, quel qu'il soit, lié au MATERIEL fourni par Tel-Aviv University ou à l'ETUDE et qui serait causé à des tiers ou à l'une quelconque des parties. Le Bénéficiaire disposera du MATERIEL à ses propres risques. Le Bénéficiaire ne pourra aller à l'encontre de Tel-Aviv University en cas de perte, dommage ou torts qui pourraient être occasionnés lors de l'utilisation, la mauvaise utilisation du MATERIEL ou de toutes Informations s'y rapportant. Le Bénéficiaire défendra, indemniser et préservera Tel-Aviv University ses dirigeants, employés et agents de tous dommages, réclamations ou responsabilité pouvant résulter du stockage ou de l'utilisation du MATERIEL ou des Informations y afférent.
9. Tenir informé, sous le sceau de la confidentialité, Tel-Aviv University par l'intermédiaire d'un rapport écrit, une fois l'étude achevée. Ce rapport devra présenter les résultats de l'ETUDE obtenus avec le MATERIEL.
10. Le présent contrat ne comporte ni licence, ni renonciation, ni cession de droit, explicite ou implicite, de l'une des parties au profit de l'autre partie, à l'exception de ce qui est explicitement prévu dans le présent contrat. De tels résultats restent la propriété ou l'actif de celle des parties en ayant obtenu le bénéfice.
11. A ne pas déposer aucun titre de propriété industrielle incluant des informations confidentielles communiquées par Tel-Aviv University et à notifier, sous le sceau de la confidentialité, dans les plus brefs délais à Tel-Aviv University toute invention ou découverte résultant de l'utilisation du MATERIEL dans le cadre de l'ETUDE par le LABORATOIRE afin que soient déterminés les droits de propriété qui pourraient être conférés à Tel-Aviv University au regard des lois sur la propriété intellectuelle.

Il est entendu entre les parties que toute découverte, brevetable ou non, issus de l'utilisation par le Bénéficiaire du MATERIEL dans le cadre de l'ETUDE ("Invention Commune"), sera la copropriété du Bénéficiaire et de Tel-Aviv University Les conditions d'exploitation, directe ou indirecte, de toute Invention Commune devront faire l'objet d'un accord entre Tel-Aviv University et le Bénéficiaire avant toute acte de commercialisation.



12. Sans préjudice pour l'article 13, le présent contrat entrera en vigueur rétroactivement au 21/10/2010, date de réception du MATERIEL par le BENEFICIAIRE pour une durée de cinq (5) ans.
13. Le présent contrat pourra être résilié de plein droit par l'une des parties en cas d'inexécution d'obligation par l'autre partie d'une ou plusieurs obligations contenues dans ses clauses, un (1) mois après notification par la partie plaignante à la partie défaillante, à moins que dans ce délai la partie défaillante n'ait remédié à sa défaillance ou n'ait apporté la preuve d'un cas de force majeure..
14. A l'issue de l'ETUDE ou en cas de résiliation anticipée, le MATERIEL restant sera soit détruit soit retourné à Tel-Aviv University aux frais du BENEFICIAIRE à la seule discrétion de Tel-Aviv University.
15. Le présent contrat sera en tous points régi par et interprété conformément aux lois Françaises. Tout litige, s'il n'a pu être résolu à l'amiable entre les parties, sera soumis au tribunal compétent français en vertu du Nouveau Code de Procédure Civile.

Vous acceptez en outre de prendre en charge les frais de préparation et d'envoi du MATERIEL. Vous engagez dans cette optique à fournir à Tel-Aviv University votre numéro de compte de Fédéral Express ou tout autre société de service courrier afin que Tel-Aviv University puisse transmettre le MATERIEL au Responsable Scientifique.

**Tel-Aviv University**

Nom : **David GURWITZ**

Autorité administrative habilitée

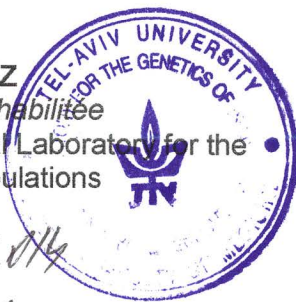
Titre : Director National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations

Date :

May 7, 2014

Signature

*David Gurwitz*



Nom : **David GURWITZ**

Director National Laboratory for the Genetics of Israeli Populations

Responsable scientifique

Date :

May 7, 2014

Signature

*David Gurwitz*

**Université Paris Descartes**

Nom : **Frédéric DARDEL**

Autorité administrative habilitée

Titre :

Date :



Paris, le 13 JUIN 2014

Signature

*Frédéric Darde*  
Frédéric DARDEL  
Président

Nom : **LORIOT Marie-Anne**  
Professeur

Responsable scientifique du  
BENEFICIAIRE

Date :

5/6 / 2014

Signature





## ANNEXE 1 – ANNEXE TECHNIQUE

### Lignées cellulaires lymphoblastoïdes (Lymphoblastoid cell lines, LCL)

1	#1105	11	#1515	21	#1740	31	#1830	41	#4991	51	#6421
2	#1112	12	#1516	22	#1747	32	#1976	42	#5000	52	#6423
3	#1116	13	#1562	23	#1751	33	#4297	43	#5040	53	#6425
4	#1126	14	#1564	24	#1754	34	#4902	44	#5452	54	#6445
5	#1131	15	#1567	25	#1801	35	#4904	45	#5519	55	#6472
6	#1236	16	#1570	26	#1807	36	#4911	46	#5534	56	#6478
7	#1363	17	#1585	27	#1810	37	#4912	47	#6037		
8	#1369	18	#1590	28	#1816	38	#4945	48	#6333		
9	#1371	19	#1728	29	#1820	39	#4973	49	#6398		
10	#1427	20	#1730	30	#1823	40	#4983	50	#6417		

### Projet de recherche / Research project

Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) sont de plus en plus utilisées comme modèle pharmacogénomique pour la recherche de facteurs prédictifs de la réponse à un médicament. Les LCL sont des lymphocytes B provenant de dons du sang de patients sains et immortalisés par EBV. Ce modèle pharmacogénomique est basé sur la réponse cellulaire, observée par l'inhibition de la prolifération cellulaire à la suite d'un traitement par un xénobiotique. Le screening d'un grand nombre de lignées permet d'isoler des lignées sensibles et résistantes selon leur profil de réponse à une molécule d'intérêt. La comparaison du transcriptome de ces deux groupes de lignées permet de définir des profils génétiques pouvant expliquer ces différences de sensibilité. Ce modèle cellulaire sera utilisé au laboratoire pour la recherche de facteurs prédictifs de la réponse aux thiopurines, médicaments utilisés chez l'homme pour leurs propriétés immunosuppressives.

*Lymphoblastoid cell lines (LCL) are increasingly used in pharmacogenomic studies for the identification of predictive biomarkers of drug response. LCL are B lymphocytes from healthy blood donors and immortalized by EBV. This pharmacogenomic model is based on cellular response measured by growth inhibition under a xenobiotic treatment. Wide screening of cell lines allows identifying sensitive and resistant cell lines according to cellular response to a molecule of interest. Transcriptomic comparison of these two groups of cells leads to assess genetic profiles associated with sensitivity differences. This cellular model will be used at the laboratory to identify predictive biomarkers of thiopurine response, that are drugs used in humans for their immunosuppressive properties.*



## Annexe 7 – protocole REFAZAME

---

Protocole de recherche clinique REFAZAME

« REcherche de Facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'AZathioprine dans les Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'Enfant »

**REcherche de Facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique  
(efficacité/toxicité) à l'AZAthioprine dans les Maladies inflammatoires  
chroniques de l'intestin de l'Enfant**

**Etude REFAZAME**

Protocole version 2 du 25/03/2013

**Investigateur coordonnateur :**

Dr Laurent Chouchana  
Centre Universitaire des Saints-Pères  
UMR-S 775 INSERM / Université Paris Descartes  
45 rue des Saints-Pères  
75006 Paris  
Tel : +33 1 42 86 22 26

Etude REFAZAME

**LISTE DES PARTICIPANTS A L'ETUDE**

***Investigateur coordonnateur***

Dr. Laurent Chouchana, UMR-S 775 INSERM / Université Paris Descartes

***Centre recruteur***

Pr. Frank Ruemmele, Hôpital Necker, AP-HP (responsable données cliniques)

***Laboratoire***

Pr. Marie-Anne Lorient, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP (responsable données biologiques et pharmacogénétiques)

***Conseiller scientifique***

Pr. Philippe Beaune, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP

***Analyses statistiques***

Dr. Jean-Louis Golmard, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP

***Coordination de l'étude***

Pr Jean Marc Tréluyer  
Unité de Recherche Clinique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP

TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>RÉSUMÉ DU PROJET .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE, DONNEES DE LA LITTÉRATURE, PRE REQUIS .....</b>	<b>8</b>
3.1	INTRODUCTION ET CONTEXTE DE LA RECHERCHE .....	8
3.1.1	Efficacité .....	8
3.1.2	Toxicités .....	8
3.1.3	Place de l'azathioprine dans la thérapeutique.....	9
3.1.4	Intérêt d'étudier la population pédiatrique.....	9
3.2	IMPLICATIONS DU METABOLISME DES THIOPURINES DANS LA REPONSE CLINIQUE.....	9
3.2.1	Métabolisme des thiopurines.....	9
3.2.2	La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) : facteur prédictif de la toxicité de l'azathioprine....	10
3.2.3	Problématiques actuelles .....	11
<b>4</b>	<b>HYPOTHESES .....</b>	<b>12</b>
<b>5</b>	<b>OBJECTIFS DE LA RECHERCHE .....</b>	<b>12</b>
5.1	OBJECTIF PRINCIPAL.....	12
5.2	OBJECTIFS SECONDAIRES.....	12
5.3	OBJECTIF APPLICATIF .....	12
<b>6</b>	<b>CRITERES DE SÉLECTION DES PATIENTS .....</b>	<b>13</b>
6.1	CRITERES D'INCLUSION.....	13
6.2	CRITERES DE NON-INCLUSION .....	13
<b>7</b>	<b>CRITERES D'EVALUATION.....</b>	<b>13</b>
7.1	CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL.....	13
7.2	CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES .....	13
<b>8</b>	<b>PLAN EXPERIMENTAL.....</b>	<b>14</b>
8.1	TYPE D'ETUDE.....	14
8.2	SOURCE DE RECRUTEMENT .....	14
<b>9</b>	<b>INFORMATIONS RECUEILLIES .....</b>	<b>15</b>
9.1	LISTE DES VARIABLES OU DONNEES RECUEILLIES.....	15
9.1.1	Données extraites sur le serveur des résultats biologiques de l'HEGP .....	15
9.1.2	Données cliniques, thérapeutiques et autres données biologiques.....	15
9.1.3	Adéquation informations recueillies - critères de jugement.....	15
9.2	METHODOLOGIE DU RECUEIL DES DONNEES .....	15
9.2.1	Comment (Scores, échelles, résultats d'exams, etc.) .....	15
<b>10</b>	<b>GESTION DES DONNEES.....</b>	<b>16</b>
10.1	CIRCUIT DES DONNEES.....	16
10.1.1	Données biologiques et d'identification du patient.....	16
10.1.2	Données cliniques et thérapeutiques.....	16
10.2	ASPECTS PRATIQUES ET LOGICIELS UTILISES.....	16

<b>11</b>	<b>STATISTIQUES.....</b>	<b>17</b>
11.1	ANALYSE DU CRITERE PRINCIPAL .....	17
11.2	ANALYSE DES CRITERES SECONDAIRES.....	17
11.3	JUSTIFICATION DU NOMBRE DE SUJETS .....	17
<b>12</b>	<b>ASPECTS TECHNICO-REGLEMENTAIRES .....</b>	<b>18</b>
12.1	RESPONSABLES ET LIEUX DE L'ETUDE.....	18
12.2	ASPECTS REGLEMENTAIRES .....	18
12.2.1	Gestionnaire.....	18
12.2.2	Information des patients et recueil de la non-opposition à la recherche .....	18
12.2.3	Soumission du protocole au CCP.....	19
12.2.4	Déclaration CCTIRS – CNIL.....	19
12.2.5	Droits d'accès aux données et documents sources.....	19
12.3	CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE.....	19
12.4	RAPPORT ET PUBLICATIONS .....	20
<b>13</b>	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>21</b>
<b>14</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>23</b>
14.1	FEUILLE DE RECUEIL DES DONNEES .....	23
14.2	SCORES .....	24
14.2.1	Maladie de Crohn.....	24
14.2.2	Rectocolite hémorragique.....	25
14.3	NOTE D'INFORMATION POUR LES PATIENTS .....	26
14.3.1	Patients majeurs.....	26
14.3.2	Patients mineurs.....	26

1 RÉSUMÉ DU PROJET

Titre et Code de la recherche	Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) �� l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant : Etude REFAZAME
Justification scientifique de la recherche	Les thiopurines, l'azathioprine (AZA, Imurel��) et la 6-mercaptopurine (6-MP, Purinethol��), sont des médicaments largement prescrits dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. L'utilisation de ces médicaments, efficaces et peu coûteux, est cependant limitée par leurs toxicités. Ils sont responsables de toxicités hématologiques (leucopénie, thrombopénie) chez 10 à 20% des malades traités, sévères dans 1 à 5% des cas voire fatales dans 0,3% des cas, mais également de toxicités hépatiques ou pancréatiques dans 10% des cas. Par ailleurs, environ 10-15% des patients présentent une résistance aux thiopurines. Cette variabilité de la réponse est principalement due à la variabilité inter-individuelle de la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT), enzyme majeure du métabolisme des thiopurines, sous la dépendance d'un polymorphisme génétique. Schématiquement, chez les sujets présentant une activité TPMT nulle, ou un déficit partiel d'activité, le métabolisme de l'AZA (pro-drogue transformée en 6-MP) et de la 6-MP est dévié vers la voie enzymatique responsable de la synthèse des métabolites actifs et cytotoxiques, les 6-thioguanine nucléotides (6-TGN). Ces métabolites s'accumulent dans les tissus h��matopo��tiques et les patients sont à haut risque de toxicité hématologique sévère et précoce, en l'absence d'une réduction posologique ou de l'arrêt définitif du traitement. A l'opposé, les patients ayant une activité TPMT élevée ont un risque d'hépatotoxicité liée à la production importante de dérivés méthylés 6-méthylmercaptopurine ribonucléotides (6-MMP[R]). En outre, une résistance au traitement peut s'observer en cas d'activité TPMT très élevée, par défaut de production des métabolites actifs, les 6-TGN. Le suivi thérapeutique pharmacologique, fondé sur le dosage des 6-TGN et 6-MMP[R] érythrocytaires, permet ainsi d'expliquer les toxicités ou les résistances au traitement. Cependant une majeure partie des toxicités ne sont pas entièrement expliquées par l'activité TPMT ou le dosage des 6-TGN.
Hypothèse:	L'analyse rétrospective des données acquises au cours des dix dernières années (2002-2012) permettra la rationalisation de l'usage de ces tests et de la prise en charge thérapeutique conduisant ainsi à une amélioration des taux de réponse thérapeutique et à une diminution des toxicités.
Objectifs	
Principal:	Recherche de facteurs de risque biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques impliqués dans la survenue de toxicités suite à un traitement par AZA ou 6-MP, indiqué pour le maintien de la rémission dans les MICI, dans les 6 mois après son instauration.

Secondaires:	i. Recherche de facteurs biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques déterminants pour l'efficacité thérapeutique à 6 mois ; ii. Recherche de facteurs biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques déterminants pour l'efficacité thérapeutique à 2 ans ; iii. Prédiction de la concentration érythrocytaire en 6-TGN et 6-MMP[R] à partir de la dose d'AZA ou de 6-MP administrée, en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques.
Objectif applicatif	L'objectif applicatif est la détermination d'une posologie optimale (bénéfice/risque) d'AZA ou de 6-MP en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques pour le maintien de la rémission dans les MICI.
Critères de sélection	
Critères d'inclusion:	patient homme ou femme, ayant une MICI et traité par de l'azathioprine, et n'ayant pas exprimé son opposition : ��ge < 18 ans lors de la prise en charge
Critères de non-inclusion:	expression par le patient ou son représentant légal de son opposition au recueil des données.
Méthodologie : plan expérimental	
Etude rétrospective mono-centrique.	
Critères de jugement	
Principal:	Survenue de toxicités suite à un traitement par AZA ou 6-MP, indiqué pour le maintien de la rémission dans les MICI, dans les 6 mois après son instauration.
Secondaires:	i. Maintien de la rémission clinique dans les MICI après 6 mois de traitement par AZA ou 6-MP, sans apparition de toxicité ; ii. Survenue de tout effet indésirable et maintien de l'efficacité dans les 2 ans après l'instauration d'un traitement par AZA ou 6-MP ; iii. Calcul d'une concentration érythrocytaire en 6-TGN et 6-MMP[R] prédite à partir d'une posologie en AZA ou 6-MP.
Déroulement de l'étude	
Recueil de données rétrospectives à partir des dossiers médicaux (hôpital Necker) et du serveur des résultats biologiques de l'hôpital européen Georges Pompidou.	
Analyses statistiques	
L'analyse statistique aura lieu en deux étapes : la première univariée et la seconde multivariée.	
Perspectives (utilité) de la recherche	
Détermination d'une posologie optimale (bénéfice/risque) d'AZA ou de 6-MP en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques pour le maintien de la rémission dans les MICI.	

2 LISTE DES ABREVIATIONS

- 6-MMP : 6-méthylmercaptopurine
- 6-MMP[R] : 6-méthylmercaptopurine ribonucleotide
- 6-MP : 6-mercaptopurine
- 6-TGN : 6-thioguanine nucléotide
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ALAT : alanine amino-transférase
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- ARN : acide ribonucléique
- ASAT : aspartate amino-transférase
- AZA : azathioprine
- CRP : *C-reactive protein*
- GR : globule rouge
- MC : maladie de Crohn
- MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
- PAL : phosphatases alcalines
- PNN : polynucléaires neutrophiles
- RCH : rectocolite hémorragique
- SAM : S-adenosyl L-méthionine
- TPMT : thiopurine S-méthyltransférase
- UF : unité fonctionnelle

3 JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE, DONNEES DE LA LITTERATURE, PRE REQUIS

3.1 INTRODUCTION ET CONTEXTE DE LA RECHERCHE

L'azathioprine (AZA) et la 6-mercaptopurine (6-MP) – classe pharmacologique : thiopurines – sont des médicaments majeurs dans la prise en charge thérapeutique des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) de l'adulte et de l'enfant que sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).<sup>1,2</sup>

3.1.1 Efficacité

Dans le cadre des MICI, l'AZA est prescrite pour son efficacité dans le maintien de la rémission clinique, avec des taux de rémission à six mois et à un an de l'ordre de, respectivement, 30 et 50%.<sup>3,4</sup> Elle permet également le sevrage des patients cortico-dépendants atteints d'une MC.<sup>1,5</sup> A l'heure actuelle, c'est la seule molécule dans l'arsenal thérapeutique de la MC dont l'efficacité a été démontrée à très long terme (64 mois) avec un taux de rechute faible de 5 à 10% par an, associé à un risque de rechute entre 14 et 41% dans l'année qui suit l'arrêt du traitement.<sup>6-8</sup>

3.1.2 Toxicités

Les thiopurines sont responsables de toxicités plus ou moins sévères, notamment une toxicité hématologique et hépatique.

3.1.2.1 Toxicité hématologique

La myélotoxicité représente la toxicité majeure d'un traitement par thiopurine. Cliniquement, elle se traduit principalement par une leucopénie-neutropénie survenant, selon les études, chez 1,4 à 10% des patients traités par des doses conventionnelles de thiopurines.<sup>9,10</sup> Elle présente une incidence d'environ 3% par patient et par année de traitement et peut aboutir à une aplasie médullaire (1-5% des patients), potentiellement létale.<sup>11</sup>

3.1.2.2 Toxicité hépatique

La toxicité hépatique se traduit majoritairement par une augmentation moyenne, transitoire ou réversible, des transaminases, associée une hépatite cholestatique ou cytolytique. Environ 10% des patients traités par thiopurines présentent une augmentation des transaminases supérieure à deux fois la normale.<sup>12,13</sup>

### 3.1.3 Place de l'azathioprine dans la thérapeutique

L'AZA est un médicament central dans la prise en charge des MICI. Une impossibilité d'employer l'AZA pour toxicités ou perte d'efficacité impose le relai par des médicaments de la famille des anti-TNF comme l'infliximab ou l'adalimumab. Si les taux de rémission clinique à un an avec ces molécules sont supérieurs au placebo, ils n'excèdent pas 35%.<sup>3</sup> De plus, ces molécules entraînent un surcoût important de la prise en charge des patients. Il faut également souligner qu'aucune nouvelle thérapeutique majeure n'est attendue dans les prochaines années dans la prise en charge des MICI.

### 3.1.4 Intérêt d'étudier la population pédiatrique

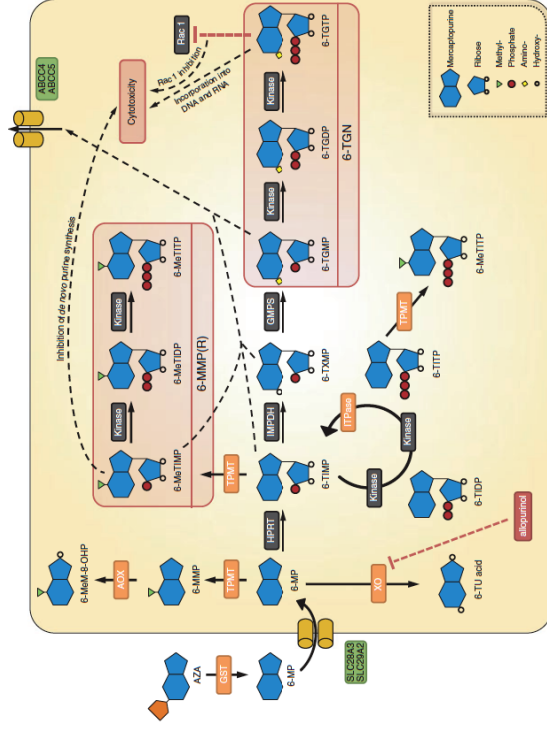
Les MICI sont souvent diagnostiquées chez l'adulte jeune, mais peuvent survenir à tout âge et 15% des cas touchent les enfants. Les thiopurines, dont l'efficacité chez l'enfant a été prouvée, constituent un classe thérapeutique particulièrement importante en pédiatrie d'autant que le traitement est envisagé pour un très longue période et qu'il est nécessaire chez ces patients de diminuer les corticoïdes.<sup>14</sup> Par ailleurs, peu d'études sont disponibles chez l'enfant dans la littérature.<sup>15</sup>

Il apparaît donc important d'optimiser au mieux cette ligne de traitement en pédiatrie, notamment à l'aide d'un algorithme de prescription permettant d'améliorer la balance bénéfice/risque aux thiopurines.

### 3.2 IMPLICATIONS DU METABOLISME DES THIOPURINES DANS LA REPONSE CLINIQUE

### 3.2.1 Métabolisme des thiopurines

L'AZA est une pro-drogue nécessitant une bioactivation, *via* un métabolisme complexe, afin d'exercer son effet thérapeutique (Fig. 1). De nombreuses enzymes sont impliquées dans ce métabolisme, la mieux connue étant la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT). *In fine*, les métabolites produits à partir de l'AZA sont les 6-thioguanine nucléotides (6-TGN), très largement responsables de l'effet immunosuppresseur, et les dérivés méthylés ou 6-méthylmercaptapurine ribonucléotides (6-MMP[R]).



**Figure 1. Métabolisme des thiopurines.**<sup>16</sup>

Une concentration sanguine élevée en 6-TGN entraîne leur accumulation dans les tissus hématopoïétiques qui est à l'origine de la toxicité hématologique importante. Par ailleurs, une concentration élevée de manière durable en 6-MMP[R] est très probablement à l'origine de la toxicité hépatique.<sup>16</sup>

### 3.2.2 La thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) : facteur prédictif de la toxicité de l'azathioprine

La variabilité inter-individuelle du métabolisme de l'AZA explique une part importante de la variabilité dans la réponse clinique à ce médicament. En particulier, la TPMT, enzyme clé de ce processus métabolique, présente des variations d'activité importantes en lien avec un polymorphisme génétique. Ainsi, si 89% des individus présentent une activité élevée/normale, environ 11% présentent un déficit partiel d'activité et sont porteurs d'un allèle muté (hétérozygote), et moins de 1% a déficit complet d'activité, porteur de deux allèles mutés (homozygote muté).<sup>17</sup>

A ce jour, une trentaine de variants alléliques du gène de la TPMT a été identifiée, dont les 4 plus fréquents (\*2, \*3A, \*3B, \*3C) représente environ 95% des mutations.<sup>18,19</sup> En l'absence de traitement par thiopurine, elles sont sans aucune conséquence physiopathologique pour l'individu porteur d'une de ces mutations.



La réponse thérapeutique à l'AZA dépend de la concentration intra-érythrocytaire en 6-TGN, dont la production est en relation étroite avec l'activité TPMT.<sup>20,21</sup>

Le risque de myélotoxicité est augmenté chez les patients porteurs d'un déficit enzymatique de la TPMT, partiel ou complet, via une accumulation des 6-TGN.<sup>22,23</sup> Ainsi, la mesure de l'activité TPMT (ou la prédiction de l'activité par le génotype TPMT) *a priori* permet de dépister les patients ayant un déficit d'activité complet (homozygotes mutés) ou partiel (hétérozygotes) qui sont, respectivement, à très haut risque et à risque élevé de développer une toxicité hématologique sévère et précoce, en l'absence d'une réduction posologique ou de l'arrêt du traitement.<sup>24</sup>

Inversement, en cas d'activité TPMT très élevée, la formation de 6-TGN est réduite par déviation du métabolisme de l'AZA vers la voie de production des dérivés méthylés 6-MMP[R] avec risque accru de toxicité hépatique.<sup>23</sup> Ces patients ont très probablement une moins bonne réponse thérapeutique aux posologies usuelles, voire une résistance pharmacologique aux thiopurines.<sup>22,25</sup> Par ailleurs, de façon intéressante, une augmentation du risque de toxicité hématologique a été rapportée chez ces patients.<sup>21</sup>

3.2.3 Problématiques actuelles

A ce jour, l'existence d'une concentration efficace en 6-TGN reste encore débattue et ne fait pas consensus dans la littérature.<sup>26,27</sup> Trois études cliniques ont pourtant déterminé une concentration minimale des 6-TGN dans les globules rouges pour obtenir une efficacité thérapeutique.<sup>23,25,28</sup> Inversement, trois autres études n'ont pas mis en évidence de différence de concentration en 6-TGN entre les répondeurs et les non répondeurs.<sup>20,29,30</sup>

Malgré ces discordances, toutes les études montrent que ce dosage est utile, soit en cas d'inefficacité de l'AZA – recherche d'une non-observance ou suspicion d'une activité TPMT élevée, soit en cas d'effets indésirables.<sup>1,6,31,32</sup>

Par ailleurs, un tiers seulement des toxicités hématologiques est expliqué par le déficit en TPMT et l'existence d'autres facteurs génétiques (polymorphismes au niveau d'autres enzymes du métabolisme des thiopurines) ou environnementaux (déficit en vitamine B12 ou en folates...) semblent impliqués.<sup>33,34</sup>

4 HYPOTHESES

Les thiopurines, médicaments essentiels dans les MICI, présentent une variabilité inter-individuelle importante dans leur réponse clinique. Malgré une efficacité largement démontrée dans le maintien de la rémission, le traitement est interrompu dans environ un tiers des cas pour toxicités ou résistance au traitement.

Cette variabilité est principalement liée au métabolisme complexe des thiopurines, et en particulier au rôle clé d'une enzyme détoxifiante, la TPMT. La compréhension de ce métabolisme, notamment avec la prédiction de la capacité métabolique vis-à-vis de la TPMT, associé au dosage des métabolites 6-TGN et 6-MMP[R] permet une individualisation thérapeutique.

L'analyse rétrospective des données acquises au cours des dix dernières années (2002-2012) permettra la rationalisation de l'usage de ces tests et de la prise en charge thérapeutique conduisant ainsi à une amélioration des taux de réponse thérapeutique et à une diminution des toxicités.

5 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

5.1 OBJECTIF PRINCIPAL

L'objectif principal est la recherche de facteurs de risque biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques impliqués dans la survenue de toxicités suite à un traitement par AZA ou 6-MP, indiqué pour le maintien de la rémission dans les MICI, dans les 6 mois après son instauration.

5.2 OBJECTIFS SECONDAIRES

Les objectifs secondaires sont :

- i. la recherche de facteurs biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques déterminants pour l'efficacité thérapeutique à 6 mois ;
- ii. la recherche de facteurs biologiques, génétiques, thérapeutiques ou cliniques déterminants pour l'efficacité thérapeutique ou la survenue de toxicités à 2 ans ;
- iii. la prédiction de la concentration érythrocytaire en 6-TGN et 6-MMP[R] à partir de la dose d'AZA ou de 6-MP administrée, en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques ;

5.3 OBJECTIF APPLICATIF

L'objectif applicatif est la détermination d'une posologie optimale (bénéfice/risque) d'AZA ou de 6-MP en fonction de paramètres thérapeutiques, biologiques, génétiques et cliniques pour le maintien de la rémission dans les MICI.

6 CRITERES DE SÉLECTION DES PATIENTS

6.1 CRITERES D'INCLUSION

- Patient (homme ou femme) ayant été pris en charge pour MICI à l'hôpital Necker en Gastroentérologie pédiatrique ; âge < 18 ans lors de la prise en charge;
- Initiation de traitement par AZA ou 6-MP ;
- Phénotypage ou génotypage ou dosage 6-TGN/6-MMP[R] à l'UF Pharmacogénétique de l'hôpital européen Georges Pompidou entre 2002 et 2012.

6.2 CRITERES DE NON-INCLUSION

- Patient (ou titulaire de l'exercice de l'autorité parentale pour les patients ayant encore moins de 18 ans) ayant exprimé son opposition au recueil rétrospectif de données.

7 CRITERES D'EVALUATION

7.1 CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

Le critère de jugement principal est la survenue de tout effet indésirable dans les 6 mois après l'instauration d'un traitement par AZA ou 6-MP.

Les effets indésirables d'un traitement par AZA ou 6-MP sont définis comme suit :

- Toxicité hématologique
  - taux d'hémoglobine < 10 g/L, ou
  - leucocytes < 3,0 G/L, ou
  - PNN < 1,5 G/L, ou
  - plaquettes < 75 G/L ou
  - lymphocytes < 1,0 G/L ;
- Toxicité hépatique
  - ASAT ou ALAT > 2,5 N ;
- Toxicité pancréatique
  - lipase sérique > 3 N ;
- Toxicité gastro-intestinale : rapportée par patient lors de consultation médicale ;
- Toutes autres toxicités liées au traitement par AZA.

Toute baisse de posologie d'AZA ou de 6-MP, ou arrêt de traitement, dans les 6 mois suivant l'instauration sera également considéré comme une sanction du critère de jugement principal.

7.2 CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRES

Les critères de jugement secondaires sont :

- i. le maintien de la rémission clinique dans les MICI après 6 mois de traitement par AZA ou 6-MP, sans apparition de toxicité ;

La rémission clinique est définie par :

- MC luminale : score HBI < 5 sans corticothérapie ;
  - MC anopérinéale : la fermeture d'au moins 50% des trajets fistuleux ;
  - RCH : score PUCAI < 10 sans corticothérapie.
- L'absence de réponse ou inefficacité thérapeutique est considérée en cas de :
- Persistance d'une corticodépendance (impossibilité de diminuer la corticothérapie en dessous d'un seuil de 10 mg/j de prednisolone ou de 3mg/j de budésomide dans les 3 premiers mois de traitement sans récurrence clinique, ou récurrence dans les trois mois suivant l'arrêt des stéroïdes)<sup>35</sup> ;
  - Existence d'une corticorésistance (persistance d'une activité clinique malgré un équivalent prednisolone à 0,75 mg/kg/j depuis au moins un mois) ;
  - Persistance d'une activité clinique de la maladie ou d'une rechute malgré 9 mois de traitement :
    - o MC : score HBI > 5 ;
    - o RCH : score PUCAI > 10 ;
  - Nécessité d'un changement thérapeutique ou d'un geste chirurgical au cours de l'étude, pour échec thérapeutique ;
  - Fermeture de moins de 50% des fistules à 6 mois dans le cas d'une MC anopérinéale.

- ii. la survenue de tout effet indésirable et le maintien de l'efficacité dans les 2 ans après l'instauration d'un traitement par AZA ou 6-MP ;
- iii. le calcul d'une concentration érythrocytaire en 6-TGN et 6-MMP[R] prédite à partir d'une posologie en AZA ou 6-MP.

8 PLAN EXPÉRIMENTAL

8.1 TYPE D'ETUDE

Il s'agit d'une étude rétrospective à partir des résultats biologiques et des dossiers médicaux. Ces données seront colligées au sein d'une base de données (BDD) clinico-biologique. Aucune donnée ne sera collectée en prospectif et aucun examen supplémentaire ne sera réalisé.

8.2 SOURCE DE RECRUTEMENT

Les patients ont été pris en charge dans le service de Gastro-entérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques (Pr. Frank Ruemmele, Pr. Olivier Goulet) de l'hôpital Necker (AP-HP) à Paris.

Les prélèvements biologiques de ces patients (génotypage/phénotypage de la TPMT, dosage des 6-TGN et 6-MMP[R]) ont été adressés à l'UF de Pharmacogénétique et oncologie moléculaire (Pr. Marie-Anne Lortiot, Pr. Philippe Beaune) de l'hôpital européen Georges Pompidou (AP-HP) à Paris.

Les patients seront identifiés à partir d'une liste informatique provenant des demandes de phénotypage ou génotypage ou dosage de 6-TGN/6-MMP[R] effectués à l'hôpital européen Georges Pompidou (AP-HP) à Paris.

9 INFORMATIONS RECUEILLIES

9.1 LISTE DES VARIABLES OU DONNEES RECUEILLIES

9.1.1 Données extraites sur le serveur des résultats biologiques de l'HEGP

DONNEES IDENTIFICATION PATIENT	DONNEES PHARMACOGENETIQUES
NOM	PHENOTYPE TPMT
PRENOM	GENOTYPE TPMT
DATE DE NAISSANCE	DOSAGE 6-TGN
SEXE	DOSAGE 6-MMP [ R ]
UNITE D'HOSPITALISATION	

Après extraction le nom et le prénom des patients seront remplacés par leurs initiales et un numéro d'identification unique dans la base de données.

9.1.2 Données cliniques, thérapeutiques et autres données biologiques

Cf. Fiche de recueil des données (Annexe 14.1).

9.1.3 Adéquation informations recueillies - critères de jugement

Les critères de jugement sont basés sur l'apparition de toxicités ou le maintien de l'efficacité six mois (critère principal) ou deux ans (critères secondaires) après l'instauration d'un traitement par AZA ou 6-MP. Ils permettront de faire des corrélations clinico-biologiques afin de définir une posologie optimale dans le maintien de la rémission dans les MICI.

Ainsi, toutes les données concernant la toxicité, l'efficacité ou l'absence de réponse seront recueillies sur les deux ans suivant l'instauration d'un traitement par AZA ou 6-MP. Une fiche de recueil sera remplie par visite du patient, soit a priori tous les 3 mois. Les données sont mentionnées dans l'annexe 14.1 (Fiche de recueil des données). Elles seront corrélées aux données thérapeutiques et pharmacogénétiques (phénotype et génotype TPMT, concentration érythrocytaire en 6-TGN et en 6-MMP[R]).

9.2 METHODOLOGIE DU RECUEIL DES DONNEES

9.2.1 Comment (Scores, échelles, résultats d'examen, etc.)

L'activité clinique de la MC et de la RCH sera établie grâce à des scores internationalement validés, établis à l'aide de questionnaires rapides et facile d'accès (cf. Annexe 14.2) :

- score *Harvey-Bradshaw Index* (HBI) pour la MC ;
- score *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index* (PUCAI) pour la RCH.

10 GESTION DES DONNEES

10.1 CIRCUIT DES DONNEES

10.1.1 Données biologiques et d'identification du patient

Les données d'identification du patient et les données biologiques de pharmacogénétique (génotypage/phénotypage de la TPMT, dosage des 6-TGN et 6-MMP[R]) sont stockées sur le serveur informatique des résultats de biologie (Netlab) à l'hôpital européen Georges-Pompidou. Elles sont obtenues par extraction informatique avec l'aide du Département d'informatique hospitalière de l'hôpital.

Les autres données biologiques seront obtenues soit à partir du serveur informatique des résultats de biologie de l'hôpital Necker, soit à partir du dossier médical du patient.

10.1.2 Données cliniques et thérapeutiques

Les données cliniques et thérapeutiques sont obtenues à partir du dossier médical du patient à l'hôpital Necker. Un technicien de recherche clinique sera recruté et encadré par l'Unité de Recherche Clinique (URC) de l'hôpital Necker pour recueillir les données sur une base de donnée sur un ordinateur indépendant non relié au réseau.

10.2 ASPECTS PRATIQUES ET LOGICIELS UTILISES

Le data management sera réalisé par l'URC de l'hôpital Necker :

- Une liste des variables de l'étude sera élaborée par l'URC, en lien avec les investigateurs de l'étude et le biostatisticien.
- Cette liste permettra l'élaboration, par l'URC d'une base de données au format Access où les données seront saisies après contrôle qualité.
- Un plan de data-management, élaboré conjointement par le data-manager, l'investigateur principal et le statisticien sera mis en œuvre.
- Après correction des erreurs que ce plan aura montrées, la base de données sera gelée pour analyse statistique.

Les données seront collectées et conservées sous la responsabilité du responsable de l'URC Necker, le Professeur Jean Marc Tréluyer

Les données seront ensuite transmises à l'Unité fonctionnelle de Bio-statistiques de l'hôpital Pitié-Salpêtrière pour l'analyse statistique. Le logiciel utilisé sera SAS V9. Les résultats de ces analyses seront intégrés au rapport final de la recherche. Ces analyses seront réalisées sous la responsabilité du Docteur Jean-Louis Golmard.

11 STATISTIQUES

11.1 ANALYSE DU CRITERE PRINCIPAL

Le critère principal est la survenue d’au moins un effet indésirable dans les 6 mois suivant l’instauration d’un traitement par AZA ou 6-MP. Il s’agit d’un critère binaire, car les individus n’ayant pas un suivi de 6 mois seront exclus de l’étude.

L’objectif principal est de rechercher les facteurs de risque de toxicité. L’analyse sera effectuée en deux étapes, la première univariée et la seconde multivariée.

- Dans l’analyse univariée, les relations entre l’apparition d’un effet indésirable et les variables qualitatives seront testées par des tests du  $\chi^2$  ou de Fisher exact, si au moins un effectif calculé est inférieur à 5, pour les variables qualitatives et des tests de Student pour les variables quantitatives, si le nombre de patients avec au moins un effet indésirable est supérieur ou égal à 30. Dans le cas contraire, les variables quantitatives seront analysées par une approche non paramétrique, avec des tests de Mann et Whitney.

Au terme de l’analyse univariée, des facteurs de risque de toxicité auront été déterminés. Le but de l’analyse multivariée est de construire un score de risque de toxicité et de déterminer un sous-ensemble de facteurs de risque « indépendants ».

- L’analyse multivariée sera basée sur la régression logistique pas-à-pas ascendante. Les variables incluses dans la régression seront celles qui sont significatives à  $p < 0,10$  dans l’analyse univariée, et les variables retenues dans le modèle final seront celles qui sont significatives à  $p < 0,05$  par le test de Wald.

11.2 ANALYSE DES CRITERES SECONDAIRES

- Le maintien de la rémission clinique sans apparition de toxicité et l’absence de réponse au traitement, dans les 6 mois, sont des critères binaires, comme le critère principal, et seront analysés avec la même méthodologie statistique.
- Le maintien de la rémission clinique sans apparition de toxicité et l’absence de réponse au traitement ainsi que la survenue d’au moins un effet indésirable dans les 2 ans, sont des critères binaires, comme le critère principal, et seront analysés avec la même méthodologie statistique.
- La prédiction des concentrations érythrocytaires en 6-TGN et 6-MMP[R] sera basée sur des modèles linéaires, incluant notamment la posologie en AZA ou 6-MP comme variables explicatives, mais les autres facteurs potentiels, en particulier génétiques, seront aussi candidats pour les modèles linéaires prédictifs.

11.3 JUSTIFICATION DU NOMBRE DE SUJETS

Le nombre de sujets nécessaires a été calculé avec les hypothèses suivantes : il s’agit de réaliser un test de Wald dans le cadre d’un modèle logistique. On cherche à obtenir une p-value inférieure à 0,05 avec une puissance égale à 0,80.

Pour les variables qualitatives binaires, considérant :

- une probabilité de présence de la modalité péjorative à 20%,
  - une probabilité de toxicité de 30% en absence de facteur de risque,
  - un odds-ratio de 2
  - et un  $R^2$  du facteur avec tous les autres de 0,1,
- il faut inclure 475 patients.

Pour les variables quantitatives, considérant :

- une prévalence de toxicité de 0,25 pour la valeur moyenne de la variable et de 0,35 pour une valeur de la variable égale à la moyenne plus un écart-type,
  - un  $R^2$  de cette variable avec toutes les autres de 0,5,
- il faut inclure 364 patients.

Au total, l’inclusion de 500 patients semble donc compatible avec une bonne puissance de l’étude sous des hypothèses réalistes.

12 ASPECTS TECHNIQUE-REGLEMENTAIRES

12.1 RESPONSABLES ET LIEUX DE L'ETUDE

Les responsables de l’étude sont :

- |   |  |
|---|--|
| - Pr. Frank Ruennele  | - Pr. Marie-Anne Lorient                                       |
| Service Gastro-entérologie, hépatologie et nutrition pédiatriques | Unité fonctionnelle Pharmacogénétique et oncologie moléculaire |
| Hôpital Necker  | Hôpital européen Georges Pompidou                              |
| 149 rue de Sèvres, 75015 Paris                                    | 20 rue Leblanc, 75015 Paris                                    |
| Tel : 01.44.49.25.60  | Tel : 01.56.09.38.82   |

12.2 ASPECTS REGLEMENTAIRES

12.2.1 Gestionnaire

L’AP-HP sera le gestionnaire de cette étude. Le financement de la recherche est assuré par l’Inserm.

12.2.2 Information des patients et recueil de la non-opposition à la recherche

Un formulaire de non-opposition (cf. Annexe) sera envoyé par courrier postal aux titulaires de l’exercice de l’autorité parentale accompagné d’un courrier signé par le Pr. Frank Ruennele (hôpital Necker). Les adresses seront obtenues grâce au logiciel GILDA (AP-HP)

12.2.3 Soumission du protocole au CCP

Cette recherche est définie comme recherche non interventionnelle d’après le 1° alinéa de l’article L1121.1 du Code de la Santé Publique. Il n’est donc pas prévu de demande d’avis d’un Comité de Protection des Personnes (CPP).  
Cependant, s’agissant de patients mineurs, un avis sera demandé à un comité éthique pour la recherche avant l’envoi de formulaire de non-opposition.  
Le gestionnaire et l’URC devront être informés de tout projet de modification du protocole par l’investigateur coordonnateur.

12.2.4 Déclaration CCTIRS – CNIL

Cette recherche est soumise à la loi du 6 janvier 1978 relative à l’informatique, aux fichiers et aux libertés, modifiée.  
Cette recherche est définie comme recherche non interventionnelle d’après le 1° alinéa de l’article L1121.1 du Code de la Santé Publique et n’entre pas dans le champ d’application de la procédure MR-001 de la CNIL. S’agissant d’une étude monocentrique, une déclaration normale sera déposée à la CNIL.

12.2.5 Droits d’accès aux données et documents sources

Les personnes chargées du contrôle de qualité de la recherche et dûment mandatées à cet effet par l’investigateur coordonnateur ont accès, sous réserve de l’accord des personnes concernées, aux données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle ; elles sont soumises au secret professionnel dans les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal.

12.3 CONSERVATION DES DOCUMENTS ET DES DONNEES RELATIVES A LA RECHERCHE

Les documents de la recherche non interventionnelle seront archivés pendant une durée de 15 ans. L’investigateur de chaque centre participant archivera le dossier permanent de la recherche et une copie de tous les CRFs des patients recrutés au sein de son service.

Le gestionnaire archivera :

- le dossier permanent de la recherche,
- l’original de tous les CRFs des patients recrutés,
- le rapport final de la recherche provenant de l’analyse statistique et du contrôle qualité de l’étude,
- la base de données ayant donné lieu à l’analyse statistique.

12.4 RAPPORT ET PUBLICATIONS

Le rapport final de la recherche sera écrit en collaboration par l’investigateur coordonnateur et le biostatisticien pour cette recherche. Ce rapport sera soumis à chacun des investigateurs pour avis. Une fois qu’un consensus aura été obtenu, la version finale devra être adressée au gestionnaire dans les meilleurs délais après la fin effective de la recherche.  
L’AP-HP et l’Inserm seront co-propriétaires des données et aucune utilisation ou transmission à un tiers ne peut être effectuée sans leur accord préalable.  
Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l’élaboration du protocole et son déroulement ainsi qu’à la rédaction des résultats.  
L’Assistance Publique-Hôpitaux de Paris doit être mentionnée comme étant gestionnaire de la recherche. Les termes « Assistance Publique-Hôpitaux de Paris » et « Inserm » doivent apparaître dans l’adresse des auteurs.

### 13 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Prefontaine, E., Sutherland, L. R., Macdonald, J. K. & Cepoiu, M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 CD000067 (2009).doi:10.1002/14651858.CD000067.pub2
2. Timmer, A., McDonald, J. W. D. & Macdonald, J. K. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 CD000478 (2007).doi:10.1002/14651858.CD000478.pub2
3. Colombel, J. F. *et al.* Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med* **362**, 1383–1395 (2010).
4. Prefontaine, E., Macdonald, J. K. & Sutherland, L. R. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 CD000545 (2010).doi:10.1002/14651858.CD000545.pub3
5. Pearson, D. C., May, G. R., Fick, G. H. & Sutherland, L. R. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease: A meta-analysis. *Ann. Intern. Med* **123**, 132–142 (1995).
6. Lemann, M. *et al.* A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* **128**, 1812–1818 (2005).
7. Treton, X. *et al.* Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* **7**, 80–85 (2009).
8. O'Donoghue, D. P., Dawson, A. M., Powell-Tuck, J., Bown, R. L. & Lennard-Jones, J. E. Double-blind withdrawal trial of azathioprine as maintenance treatment for Crohn's disease. *Lancet* **2**, 955–957 (1978).
9. Connell, W. R., Kamm, M. A., Ritchie, J. K. & Lennard-Jones, J. E. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* **34**, 1081–1085 (1993).
10. Lennard, L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* **51**, 143–146 (2002).
11. Gisbert, J. P. & Gomollón, F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am. J. Gastroenterol* **103**, 1783–1800 (2008).
12. Bastida, G. *et al.* Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther* **22**, 775–782 (2005).
13. Kirschner, B. S. Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **115**, 813–821 (1998).
14. Markowitz, J., Grancher, K., Kohn, N., Lesser, M. & Daum, F. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**, 895–902 (2000).
15. Riello, L. *et al.* Tolerance and efficacy of azathioprine in pediatric Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 2138–2143 (2011).
16. Chouchana, L., Narjoz, C., Beaune, P., Lorient, M.-A. & Roblin, X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **35**, 15–36 (2012).
17. Weinsilboum, R. M. & Sladek, S. L. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet* **32**, 651–662 (1980).
18. Szumlanski, C. *et al.* Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol* **15**, 17–30 (1996).
19. Loennechen, T. *et al.* Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin. Pharmacol. Ther* **70**, 183–188 (2001).
20. Lowry, P. W. *et al.* Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **49**, 665–670 (2001).
21. Hindorf, U. *et al.* Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* **55**, 1423–1431 (2006).
22. Ansari, A. *et al.* Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther* **16**, 1743–1750 (2002).
23. Dubinsky, M. C. *et al.* Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **118**, 705–713 (2000).

24. Relling, M. V. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther* **89**, 387–391 (2011).
25. Cuffari, C., Dassopoulos, T., Tumbough, L., Thompson, R. E. & Bayless, T. M. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol* **2**, 410–417 (2004).
26. Roblin, X., Heluwaert, F. & Bonaz, B. Surveillance des traitements immunosuppresseurs au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Hépatogastro* **12**, 113–21 (2005).
27. Roblin, X., Oussalah, A., Phelip, J.-M. & Peyrin-Biroulet, L. [Azathioprine metabolism: what to do or not to do in clinical practice?]. *Gastroenterol. Clin. Biol* **33**, 172–175 (2009).
28. Cuffari, C., Théorêt, Y., Latour, S. & Seidman, G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* **39**, 401–406 (1996).
29. Belaiche, J., Desager, J. P., Horsmans, Y. & Louis, E. Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol* **36**, 71–76 (2001).
30. González-Lama, Y. *et al.* Thiopurine methyl-transferase activity and azathioprine metabolite concentrations do not predict clinical outcome in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 544–554 (2011).
31. Roblin, X., Serres Debeauvais, F., Phelip, J. M., Bessard, G. & Bonaz, B. Intérêt d'un monitoring précoce des 6-TGN au cours des MICI sous azathioprine: étude prospective chez 120 patients. *Gastroenterol. Clin. Biol* **28** (2004).
32. Bonaz, B. Résistance à l'azathioprine au cours des maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin. *Post U. 20e Journées Nationales de Formation Continue en Hépatogastro-entérologie*, Nantes 97–102 (2002).
33. Colombel, J. F. *et al.* Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* **118**, 1025–1030 (2000).
34. Dewit, O. *et al.* Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin. Biochem.* **44**, 1062–1066 (2011).
35. Travis, S. P. L. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **55 Suppl 1**, i16–35 (2006).
36. Harvey, R. & Bradshaw, J. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* **315**, 514 (1980).
37. Turner, D. *et al.* Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology* **133**, 423–432 (2007).

## 14 ANNEXES

### 14.1 FEUILLE DE RECUEIL DES DONNEES

**DONNEES PATIENT**

- ☐ **Initiales patient ; Date de naissance**
- ☐ **Date visite**
- ☐ **Poids**

➤ **PATHOLOGIE**

- Pathologie : ☐ Maladie de Crohn ☐ RCH ☐ Autre : .....  
 Date de diagnostic :  
 Localisation :  
 Présence de fistules : ☐ Périanales ☐ Intra-abdominales ☐ Non  
 Présence d'abcès : ☐ Périanaux ☐ Intra-abdominaux ☐ Non  
 Retard de croissance : ☐ Oui ☐ Non  
 Classification de Montréal et/ou Paris :  
 Forme familiale (au moins un autre membre de la famille atteint) : ☐ Oui ☐ Non  
 Date instauration de traitement par thiopurines :

➤ **CLINIQUE**

- **Score HBI :** ☐ HBI < 5 (rémission clinique) ☐ HBI ≥ 5 (maladie évolutive)  
 ○ **Score PUCAL :** ☐ PUCAL < 10 (rémission clinique) ☐ PUCAL ≥ 10 (maladie évolutive)  
 ○ **Allergie aux thiopurines :** ☐ Oui ☐ Non ☐ Si oui, type : \_\_\_\_\_  
 ○ **Effets indésirables gastro-intestinaux des thiopurines :** ☐ Oui ☐ Non

➤ **THERAPEUTIQUE**

- ☐ Médicament : ☐ azathioprine IMUREL® ☐ 6-mercaptopurine PURINETHOL®  
☐ Posologie journalière :     mg en ☐ une prise/jour ☐ deux prises/jour  
☐ Co-traitements (avec posologie)  
☐ Allopurinol ☐ 5-ASA ☐ Sulfasalazine ☐ Corticoïdes  
☐ Infliximab ☐ Adalimumab

► **BIOLOGIE**

- **Bilan hématologique** : GR, Hb, Hte, GB, Lympho, PNN, Plaquettes
- **Bilan hépatique** : ASAT, ALAT, PAL, GGT, Bilirubine
- **Bilan pancréatique** : Amylase, Lipase
- **Autres** : CRP, VS, albumine
- **Anticorps** : ANCA, ASCA
- **Pharmacogénétique** : activité *TPMT*, génotype *TPMT*, 6-TGN, 6-MMP[R]

## 14.2 SCORES

### 14.2.1 Maladie de Crohn

➤ *Score HBI (Harvey-Bradshaw Index)*<sup>36</sup>

# Indice de Harvey-Bradshaw

*mesure l'activité de la maladie de Crohn*  
(relevé sur une journée)

Le 2/6/112

1- Nombre de selles liquides ou très molles :

2- Douleurs abdominales :

3- Bien-être général :

4- Autres éléments liés à la maladie :

Cocher chaque catégorie d'éléments présents :

1- arthrite, arthralgie ☐

2- ictus, uvéïte ☐

3- érythème noueux, *Pyoderma gangrenosum*, stomatite aphthueuse ☐

4- fissures, fistule, abcès anal ou périnéal ☐

5- autre fistule ☐

6- fièvre > 38 °C durant la semaine ☐

5- Masse abdominale :

0 = absent ; 1 = douteuse ; 2 = certaine ; 3 = certaine avec défense

Score de Harvey-Bradshaw :

14.2.2 Rectocolite hémorragique

➤ Score PUCAI (*Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*) de Turner *et al.*<sup>37</sup>

Item	Points
1. Abdominal pain	
No pain	0
Pain can be ignored	5
Pain cannot be ignored	10
2. Rectal bleeding	
None	0
Small amount only, in <50% of stools	10
Small amount with most stools	20
Large amount (>50% of the stool content)	30
3. Stool consistency of most stools	
Formed	0
Partially formed	5
Completely unformed	10
4. Number of stools per 24 h	
0–2	0
3–5	5
6–8	10
>8	15
5. Nocturnal stools (any episode causing wakening)	
No	0
Yes	10
6. Activity level	
No limitation of activity	0
Occasional limitation of activity	5
Severely restricted activity	10
Sum of PUCAI (0–85)	

<10 = remission, 10–34 = mild activity, 35–64 = moderate activity, >65 = severe activity (22). PUCAI = Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index.

14.3 NOTE D'INFORMATION POUR LES PATIENTS

14.3.1 Patients majeurs

(cf. pages 27–29)

14.3.2 Patients mineurs

(cf. pages 30–32)



**Note d'information dans le cadre de l'étude rétrospective**  
**« Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique**  
**(efficacité/toxicité) à l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de**  
**l'intestin de l'enfant »**

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de la prise en charge de votre maladie de Crohn ou de votre rectocolite hémorragique, vous avez été traité ou vous êtes actuellement traité par azathioprine (Imurel®).

Le Professeur Frank Ruemmele vous propose qu'une partie des données recueillies dans le cadre de votre prise en charge soit utilisée dans un but de recherche scientifique et médicale.

L'objectif de ce document est de fournir des informations qui vous permettront de comprendre le but de cette étude. Vous pouvez à tout moment demander toute information complémentaire au Professeur Frank Ruemmele (téléphone secrétariat : 01.44.49.25.16) ou au Docteur Laurent Chouchana qui coordonne cette étude (téléphone : 01.42.86.22.26).

Votre participation à cette recherche est entièrement libre et volontaire.

Votre refus de participer à cette recherche n'affectera en rien la qualité de sa prise en charge dans le service hospitalier où il a l'habitude d'être suivi.

**Objectifs de l'étude**

L'objectif de cette recherche est d'améliorer l'utilisation de l'azathioprine chez les enfants ayant une maladie de Crohn ou une rectocolite hémorragique. Certaines données, contenues dans votre dossier médical (car ayant fait l'objet de prélèvements biologiques lors de son suivi médical régulier), par l'exploitation rétrospective, pourraient nous permettre de mieux comprendre l'évolution de la maladie, notamment les effets secondaires qui auraient pu être notés avec ce médicament. Nous espérons que cette meilleure connaissance nous permettra à l'avenir de mieux prescrire ce médicament chez les autres enfants atteints de ces maladies, afin d'améliorer son efficacité et diminuer la survenue d'effets indésirables.

L'azathioprine est un médicament efficace et largement prescrit dans le monde depuis de nombreuses années. Les effets bénéfiques de ce médicament pour traiter la maladie de votre enfant sont connus, mais comme pour tout médicament, chez certaines personnes, on constate des toxicités ou effets indésirables pouvant nécessiter une baisse de la dose quotidienne voire un arrêt du traitement. Il s'agit principalement de :

- toxicités hématologiques (baisse réversible du nombre de cellules sanguines),
- toxicités hépatiques (atteinte réversible des cellules du foie),
- toxicités pancréatiques (atteinte réversible des cellules du pancréas).

Ces toxicités peuvent être surveillées grâce à des analyses biologiques régulières effectuées sur un prélèvement de sang tout au long du traitement. De plus, il est également possible dans certains cas de doser la molécule active de l'azathioprine dans le sang.

Par ailleurs, chez certaines personnes, l'azathioprine est peu ou pas actif et un changement de médicament est alors nécessaire.

Les étapes de l'élimination de l'azathioprine dans le corps humain sont de mieux en mieux connues. Récemment, des équipes de recherche ont identifiés l'enzyme majeur participant à cette dégradation : la thiopurine S-méthyltransferase (TPMT). Ainsi, il s'avère qu'il existe de grandes variations d'activité de cet enzyme entre les différents individus : tout le monde n'élimine pas l'azathioprine à la même vitesse. Ces différences pourraient être à l'origine d'une partie des toxicités ou de l'absence d'efficacité suite à la prise de l'azathioprine, observées chez certaines personnes et pas d'autres. Ainsi, une dose quotidienne adaptée pour chaque personne, en fonction du résultat de l'analyse de cet enzyme devrait permettre d'observer moins de toxicités et d'avoir un traitement mieux adapté à chaque personne.

**Quelles seront les données recueillies pour la recherche ?**

Trois types de données seront recueillis à partir de votre dossier médical à l'hôpital Necker et à l'hôpital européen Georges Pompidou où ont été effectuées des analyses biologiques :

- données personnelles telles que votre âge, vos symptômes, les dates de visites.
- données biologiques en lien avec la maladie ou votre traitement.
- données de pharmacogénétiques explorant l'enzyme responsable de la dégradation du médicament dans le corps humain.

Cette étude est dite « rétrospective », c'est-à-dire que toutes ces données sont déjà présentes dans votre dossier médical et il ne vous sera demandé aucune information ni examen supplémentaire.

Les données recueillies pour l'étude sont celles collectées lors de votre prise en charge entre 2002 et 2012.

Pour cette recherche, les données seront anonymisées après collecte et seront identifiées par un numéro de code et les initiales de vos nom et prénom.

Un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière. A cette fin, des données médicales vous concernant seront transmises aux personnes agissant pour le compte de l'investigateur coordonnateur en France. Ces personnes sont tenues au secret professionnel.

**Quels sont vos droits ?**

Conformément aux dispositions de la CNIL vous disposez d'un droit d'accès et de rectification aux données vous concernant. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et de subir un traitement informatique. Vous pouvez exercer ces droits auprès du Pr Ruemmele (par téléphone 01.44.49.25.16) ou du Dr Chouchana qui coordonne cette étude (par mail : laurent.chouchana@egp.aphp.fr ou par téléphone : 01.42.86.22.26).

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble des données médicales vous concernant en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Votre dossier médical restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de votre traitement ainsi que par les autorités de santé ou par des personnes dûment mandatées par l'AP-HP dans le cadre de contrôles qualité de l'activité du service de soins et de l'Unité de Recherche Clinique. Ces personnes sont soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux en le demandant au médecin qui vous suit dans le cadre de cette recherche.

#### Dispositions réglementaires

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 2 45 rue des Saints pères, 75006 Paris, le 10/12/2012.

**Si vous vous opposez à l'utilisation de vos données dans le cadre de cette étude, merci de signer et dater le présent document et de le renvoyer (enveloppe jointe) au :**

Docteur Chouchana  
Hôpital Européen Georges Pompidou  
Service Biochimie Pharmacogénétique  
20, rue Leblanc  
75015 PARIS

**Date :**

**Nom et Prénom :**

Je soussigné, m'oppose à l'utilisation de mes données dans le cadre de l'étude intitulée « Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant ».

**Signature :**

### Note d'information dans le cadre de l'étude rétrospective « Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant »

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de la prise en charge de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique de votre enfant, il a été traité ou est actuellement traité par azathioprine (Imurel®).

Le Professeur Frank Rueemmele vous propose qu'une partie des données recueillies dans le cadre de sa prise en charge soit utilisée dans un but de recherche scientifique et médicale.

L'objectif de ce document est de fournir des informations qui vous permettront de comprendre le but de cette étude. Vous pouvez à tout moment demander toute information complémentaire au Professeur Frank Rueemmele (téléphone secrétariat : 01.44.49.25.16) ou au Docteur Laurent Chouchana qui coordonne cette étude (téléphone : 01.42.86.22.26).

La participation de votre enfant à cette recherche est entièrement libre et volontaire. Si vous acceptez que votre enfant participe à cette recherche, vous devrez l'en informer. Son refus éventuel devra être respecté.

Votre refus ou celui de votre enfant de participer à cette recherche n'affectera en rien la qualité de sa prise en charge dans le service hospitalier où il a l'habitude d'être suivi.

#### Objectifs de l'étude

L'objectif de cette recherche est d'améliorer l'utilisation de l'azathioprine chez les enfants ayant une maladie de Crohn ou une rectocolite hémorragique. Certaines données, contenues dans le dossier médical de votre enfant (car ayant fait l'objet de prélèvements biologiques lors de son suivi médical régulier), par l'exploitation rétrospective, pourraient nous permettre de mieux comprendre l'évolution de la maladie chez votre enfant, notamment les effets secondaires qui auraient pu être notés avec ce médicament. Nous espérons que cette meilleure connaissance nous permettra à l'avenir de mieux prescrire ce médicament chez les autres enfants atteints de ces maladies, afin d'améliorer son efficacité et diminuer la survenue d'effets indésirables.

L'azathioprine est un médicament efficace et largement prescrit dans le monde depuis de nombreuses années. Les effets bénéfiques de ce médicament pour traiter la maladie de votre enfant sont connus, mais comme pour tout médicament, chez certaines personnes, on constate des toxicités ou effets indésirables pouvant nécessiter une baisse de la dose quotidienne voire un arrêt du traitement. Il s'agit principalement de :

- toxicités hématologiques (baisse réversible du nombre de cellules sanguines),
- toxicités hépatiques (atteinte réversible des cellules du foie),
- toxicités pancréatiques (atteinte réversible des cellules du pancréas).

Ces toxicités peuvent être surveillées grâce à des analyses biologiques régulières effectuées sur un prélèvement de sang tout au long du traitement. De plus, il est également possible dans certains cas de doser la molécule active de l'azathioprine dans le sang.

Par ailleurs, chez certaines personnes, l'azathioprine est peu ou pas actif et un changement de médicament est alors nécessaire.

Les étapes de l'élimination de l'azathioprine dans le corps humain sont de mieux en mieux connues. Récemment, des équipes de recherche ont identifiés l'enzyme majeur participant à cette dégradation : la thiopurine S-méthyltransferase (TPMT). Ainsi, il s'avère qu'il existe de grandes variations d'activité de cet enzyme entre les différents individus : tout le monde n'élimine pas l'azathioprine à la même vitesse. Ces différences pourraient être à l'origine d'une partie des toxicités ou de l'absence d'efficacité suite à la prise de l'azathioprine, observées chez certaines personnes et pas d'autres. Ainsi, une dose quotidienne adaptée pour chaque personne, en fonction du résultat de l'analyse de cet enzyme devrait permettre d'observer moins de toxicités et d'avoir un traitement mieux adapté à chaque personne.

### Quelles seront les données recueillies pour la recherche ?

Trois types de données seront recueillis à partir du dossier médical de votre enfant à l'hôpital Necker et à l'hôpital européen Georges Pompidou où ont été effectuées des analyses biologiques :

- données personnelles telles que son âge, ses symptômes, les dates de visites.
- données biologiques en lien avec la maladie ou son traitement.
- données de pharmacogénétiques explorant l'enzyme responsable de la dégradation du médicament dans le corps humain.

Cette étude est dite « rétrospective », c'est-à-dire que toutes ces données sont déjà présentes dans le dossier médical de votre enfant et il ne lui sera demandé aucune information ni examen supplémentaire.

Les données recueillies pour l'étude sont celles collectées lors de la prise en charge de votre enfant entre 2002 et 2012.

Pour cette recherche, les données seront anonymisées après collecte et seront identifiées par un numéro de code et les initiales de ses nom et prénom.

Un traitement de ses données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière. A cette fin, des données médicales le concernant seront transmises aux personnes agissant pour le compte de l'investigateur coordonnateur en France. Ces personnes sont tenues au secret professionnel.

### Quels sont vos droits ?

Conformément aux dispositions de la CNIL vous disposez d'un droit d'accès et de rectification aux données concernant votre enfant. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et de subir un traitement informatique. Vous pouvez exercer ces droits auprès du Pr Ruenmele (par téléphone 01.44.49.25.16) ou Dr Chouchana qui coordonne cette étude (par mail : laurent.chouchana@egp.aphp.fr ou par téléphone : 01.42.86.22.26).

Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix à l'ensemble des données médicales de votre enfant en application des dispositions de l'article L 1111-7 du Code de la Santé Publique.

Le dossier médical de votre enfant restera confidentiel et ne pourra être consulté que sous la responsabilité du médecin s'occupant de son traitement ainsi que par les autorités de santé ou par des personnes dûment mandatées par l'AP-HP dans le cadre de contrôles qualité de l'activité du service de soins et de l'Unité de Recherche Clinique. Ces personnes sont soumises au secret professionnel.

A l'issue de la recherche et après analyse des données relatives à cette recherche, vous pourrez être informé(e) des résultats globaux en le demandant au médecin qui suit votre enfant dans le cadre de cette recherche. Si l'enfant ayant participé à cette recherche est devenu majeur au moment où ces résultats sont disponibles, il pourra demander lui-même à être informé des résultats globaux de la recherche.

### Dispositions réglementaires

Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile-de-France 2 45 rue des Saints pères, 75006 Paris, le 10/12/2012.

**Si vous ou votre enfant vous opposez à l'utilisation des données de votre enfant dans le cadre de cette étude, merci de signer et dater le présent document et de le renvoyer (enveloppe jointe) au :**

Docteur Chouchana  
Hôpital Européen Georges Pompidou  
Service Biochimie Pharmacogénétique  
20, rue Leblanc  
75015 PARIS

<p><b>Date :</b></p> <p><b>Nom et Prénom de l'enfant :</b></p> <p><b>Nom et Prénom du titulaire de l'exercice de l'autorité parentale :</b></p> <p><input type="checkbox"/> Je soussigné, m'oppose à l'utilisation des données de mon enfant dans le cadre de l'étude intitulée « Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant ».</p> <p><input type="checkbox"/> Mon enfant s'oppose à l'utilisation des données de mon enfant dans le cadre de l'étude intitulée « Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'azathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant ».</p> <p><b>Signature du titulaire de l'exercice de l'autorité parentale :</b></p>
---



## Annexe 8 – avis CPP REFAZAME

---

Avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ile-de-France II pour l'étude REFAZAME (cf. Article 5).

- Annexe 8 -  
**Comité de Protection des Personnes**  
*« Ile de France II »*

**IRB registration # : 00001072**

**Bureau :**

Présidente : Marie-France MAMZER-BRUNEEL

Vice-Président : Christian HERVE

Secrétaires : Pierre COLONNA, Gérard PELE

Trésorier : Stéphane DONNADIEU

**Membres :**

C. ARDIOT, H. BENECH, J.-L. BRESSON, C. BROISSAND, J.-B. CHARPENTIER, G. CHATELLIER, P. COLONNA, B. DEBAECKER, N. DELSARTE, S. DONNADIEU, J. FAGARD, C. HERVE, L. LEBOUCHER, A. LEVY, M.-F. MAMZER-BRUNEEL, E. MARTINENT, O. PARENT de CURZON, M. PARISOT, G. PELE, G. PEREIRA, R. QUERE, G. QUEVA, C. RAMBAUD, M.-C. REINMUND, M. RUDLER, P. VAN ES

Secrétariat : Danièle DEPRET-RIUS

PARIS, le 14 janvier 2013

**Réf. 2012 08 10**

Le Comité a été saisi le 10 août 2012, d'une demande du **Docteur Laurent Chouchana**, concernant une recherche non interventionnelle, intitulée :

**« Recherche de facteurs clinico-biologiques prédictifs de la réponse clinique (efficacité/toxicité) à l'AZathioprine dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin de l'enfant » Projet 12LCA-REFAZAME »**

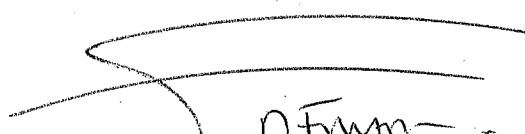
Investigateur principal : **Dr Laurent Chouchana**,

Centre Universitaire des Saints-Pères,

UMR-S 775 INSERM, Université Paris Descartes,

45 rue des Saints Pères, 75006 PARIS. Tél. 01 42 86 22 26.

Ce projet a obtenu un **avis éthique favorable** de la part des membres du CPP Ile de France II, lors de la réunion du **10/12/2012**.



Dr Marie-France MAMZER-BRUNEEL,  
Présidente



# BIBLIOGRAPHIE

---





**- A -**

1. Abe K, St George-Hyslop PH, Tanzi RE, and Kogure K (1991). Induction of amyloid precursor protein mRNA after heat shock in cultured human lymphoblastoid cells. *Neurosci. Lett.* 125(2):169-171.
2. Abraham C, and Cho JH (2009). Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 361(21):2066-2078.
3. Achkar J-P, Stevens T, Easley K, Brzezinski A, Seidner D, and Lashner B (2004). Indicators of clinical response to treatment with six-mercaptopurine or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 10(4):339-345.
4. Afif W, Loftus EV Jr, Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, and Sandborn WJ (2010). Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 105(5):1133-1139.
5. **Von Ahsen N, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, Shipkova M, et al. (2005). Association of inosine triphosphatase 94C>A and thiopurine S-methyltransferase deficiency with adverse events and study drop-outs under azathioprine therapy in a prospective Crohn disease study. *Clin. Chem.* 51(12):2282-2288.**
6. Van den Akker-van Marle ME, Gurwitz D, Detmar SB, Enzing CM, Hopkins MM, Gutierrez de Mesa E, and Ibarreta D (2006). Cost-effectiveness of pharmacogenomics in clinical practice: a case study of thiopurine methyltransferase genotyping in acute lymphoblastic leukemia in Europe. *Pharmacogenomics* 7(5):783-792.
7. Akobeng AK, and Zachos M (2004). Tumor necrosis factor-alpha antibody for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1):CD003574.
8. **Allorge D, Hamdan R, Broly F, Libersa C, and Colombel J-F (2005). ITPA genotyping test does not improve detection of Crohn's disease patients at risk of azathioprine/6-mercaptopurine induced myelosuppression. *Gut* 54(4):565.**
9. **Altman RB (2012). Translational Bioinformatics: Linking the Molecular World to the Clinical World. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91(6):994-1000.**
10. AMA Pharmacogenomics. Disponible sur : <http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/genetics-molecular-medicine/current-topics/pharmacogenomics.page> [Accédé le : July 13, 2014].
11. Amoli MM, Carthy D, Platt H, and Ollier WER (2008). EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. *Int. J. Epidemiol.* 37 Suppl 1:i41-45.
12. Andersen JB, Szumlanski C, Weinshilboum RM, and Schmiegelow K (1998). Pharmacokinetics, dose adjustments, and 6-mercaptopurine/methotrexate drug interactions in two patients with thiopurine methyltransferase deficiency. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 87(1):108-111.
13. Andoh A, Tsujikawa T, Ban H, Hashimoto T, Bamba S, Ogawa A, Sasaki M, Saito Y, and Fujiyama Y (2008). Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23(9):1373-1377.
14. Andrews JM, Travis SPL, Gibson PR, and Gasche C (2009). Systematic review: does concurrent therapy with 5-ASA and immunomodulators in inflammatory bowel disease improve outcomes? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29(5):459-469.
15. **Anglicheau D, Sanquer S, Lorient MA, Beaune P, and Thervet E (2002). Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 773(2):119-127.**
16. Annas GJ, and Elias S (2014). 23andMe and the FDA. *N. Engl. J. Med.* 370(11):985-988.
17. Anonyme (2008). Community cleverness required. *Nature* 455(7209):1.
18. **Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre E-M, Seed P, Meenan J, Yim A, and Sanderson J (2002a). Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16(10):1743-1750.**
19. **Ansari A, Arenas M, Greenfield SM, Morris D, Lindsay J, Gilshenan K, Smith M, Lewis C, Marinaki A, Duley J, et al. (2008a). Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28(8):973-983.**

20. Ansari A, Elliott T, Baburajan B, Mayhead P, O'Donohue J, Chocair P, Sanderson J, and Duley J (2008b). Long term outcome of using allopurinol co-therapy as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28(6):734–741.
21. **Ansari A, Aslam Z, De Sica A, Smith M, Gilshenan K, Fairbanks L, Marinaki A, Sanderson J, and Duley J (2008c). Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28(6):749–757.**
22. Ansari A, Patel N, Sanderson J, O'Donohue J, Duley JA, and Florin THJ (2010). Low-dose azathioprine or mercaptopurine in combination with allopurinol can bypass many adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31(6):640–647.
23. ANSM (2010). Résumé des caractéristiques du produit Imurel (azathioprine). Disponible sur : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0168346.htm> [Accédé le :April 10, 2013].
24. ANSM (2012). Résumé des caractéristiques du produit Lanvis (thioguanine). Disponible sur : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0204006.htm> [Accédé le :August 9, 2014].
25. ANSM (2013). Résumé des caractéristiques du produit Purinethol (mercaptopurine). Disponible sur : <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0223733.htm> [Accédé le :August 11, 2014].
26. Appell ML, Wennerstrand P, Peterson C, Hertvig E, and Mårtensson L-G (2010). Characterization of a novel sequence variant, TPMT\*28, in the human thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet. Genomics* 20(11):700–707.
27. **Appell ML, Wagner A, and Hindorf U (2012). A skewed thiopurine metabolism is a common clinical phenomenon that can be successfully managed with a combination of low-dose azathioprine and allopurinol. *J. Crohns Colitis*.**
28. **Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, Marinaki T, McLeod HL, Relling MV, Schaeffeler E, et al. (2013). Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet. Genomics* 23(4):242–248.**
29. Ardizzone S, Maconi G, Sampietro GM, Russo A, Radice E, Colombo E, Imbesi V, Molteni M, Danelli PG, Taschieri AM, et al. (2004). Azathioprine and mesalamine for prevention of relapse after conservative surgery for Crohn's disease. *Gastroenterology* 127(3):730–740.
30. Arijis I, Li K, Toedter G, Quintens R, Van Lommel L, Van Steen K, Leemans P, De Hertogh G, Lemaire K, Ferrante M, et al. (2009). Mucosal gene signatures to predict response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Gut* 58(12):1612–1619.
31. Ariyaratnam J, and Subramanian V (2014). Association between thiopurine use and nonmelanoma skin cancers in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109(2):163–169.
32. **Armstrong VW, Shipkova M, von Ahsen N, and Oellerich M (2004). Analytic aspects of monitoring therapy with thiopurine medications. *Ther. Drug Monit.* 26(2):220–226.**
33. Armuzzi A, Pugliese D, Danese S, Rizzo G, Felice C, Marzo M, Andrisani G, Fiorino G, Nardone OM, De Vitis I, et al. (2014). Long-term Combination Therapy with Infliximab Plus Azathioprine Predicts Sustained Steroid-free Clinical Benefit in Steroid-dependent Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*
34. **Van Asseldonk DP, de Boer NKH, Smid K, Mulder CJ, van Bodegraven AA, and Peters GJ (2010). Limited intra-individual variability in hypoxanthine-Guanine phosphoribosyl transferase, thiopurine S-methyl transferase, and xanthine oxidase activity in inflammatory bowel disease patients during 6-thioguanine therapy. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 29(4-6):284–290.**
35. ATIH Agence technique de l'information sur l'hospitalisation : Programme de médicalisation des systèmes d'information en médecine, chirurgie, obstétrique et odontologie (PMSI MCO). Disponible sur : <http://www.atih.sante.fr/mco/presentation> [Accédé le :March 30, 2014].

**- B -**

36. Bacon BR, Treuhaft WH, and Goodman AM (1981). Azathioprine-induced pancytopenia. Occurrence in two patients with connective-tissue diseases. *Arch. Intern. Med.* 141(2):223–226.
37. Baert F, Moortgat L, Van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, De Vos M, Stokkers P, Hommes D, Rutgeerts P, Vermeire S, et al. (2010). Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology* 138(2):463–468; quiz e10–11.
38. Balakireva LA, and Godard NH (2011). A continuous spectrophotometric assay for rapid measurement of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) activity in cell lysates. Disponible sur : [http://www.nature.com/app\\_notes/nmeth/2011/111406/full/an7991.html](http://www.nature.com/app_notes/nmeth/2011/111406/full/an7991.html) [Accédé le :May 22, 2014].
39. Ban H, Andoh A, Imaeda H, Kobori A, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Saito Y, and Fujiyama Y (2010). The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 45(10):1014–1021.
40. Bastida G, Nos P, Aguas M, Beltrán B, Rubín A, Dasí F, and Ponce J (2005). Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(9):775–782.
41. Baudhuin LM (2014). The FDA and 23andMe: violating the First Amendment or protecting the rights of consumers? *Clin. Chem.* 60(6):835–837.
42. **Bean R (1962). The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine. *Med. J. Aust.* 49(2):592–593.**
43. Beaugier L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J, Hébuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, et al. (2009). Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 374(9701):1617–1625.
44. Becquemont L, Alfirevic A, Amstutz U, Brauch H, Jacqz-Aigrain E, Laurent-Puig P, Molina MA, Niemi M, Schwab M, Somogyi AA, et al. (2010). Practical recommendations for pharmacogenomics-based prescription: 2010 ESF-UB Conference on Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 12(1):113–124.
45. Beesley AH, Firth MJ, Anderson D, Samuels AL, Ford J, and Kees UR (2013). Drug-gene modeling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia highlights importance of 6-mercaptopurine for outcome. *Cancer Res.* 73(9):2749–2759.
46. Behm BW, and Bickston SJ (2008). Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1):CD006893.
47. Belaiche J, Desager JP, Horsmans Y, and Louis E (2001). Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 36(1):71–76.
48. Bellazzi R, Masseroli M, Murphy S, Shabo A, and Romano P (2012). Clinical Bioinformatics: challenges and opportunities. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 14:S1.
49. Benjamini Y, and Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 289–300.
50. Benkov K, Lu Y, Patel A, Rahhal R, Russell G, Teitelbaum J, and NASPGHAN Committee on Inflammatory Bowel Disease (2013). Role of thiopurine metabolite testing and thiopurine methyltransferase determination in pediatric IBD. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56(3):333–340.
51. Bennike T, Birkelund S, Stensballe A, and Andersen V (2014). Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World J. Gastroenterol. WJG* 20(12):3231–3244.
52. Bennin DA, Don ASA, Brake T, McKenzie JL, Rosenbaum H, Ortiz L, DePaoli-Roach AA, and Horne MC (2002). Cyclin G2 Associates with Protein Phosphatase 2A Catalytic and Regulatory B' Subunits in Active Complexes and Induces Nuclear Aberrations and a G1/S Phase Cell Cycle Arrest. *J. Biol. Chem.* 277(30):27449–27467.
53. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, Cassinotti A, Cazzola P, Markopoulos K, Massari A, et al. (2010). Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 95(2):199–205.

54. **Bergan S, Bentdal O, Sødal G, Brun A, Rugstad HE, and Stokke O (1997). Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. *Ther. Drug Monit.* 19(5):502–509.**
55. Bermejo F, López-Sanromán A, Algaba A, Van-Domselaar M, Gisbert JP, García-Garzón S, Garrido E, Piqueras B, De La Poza G, and Guerra I (2010). Mercaptopurine rescue after azathioprine-induced liver injury in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31(1):120–124.
56. Bernal I, Mañosa M, Domènech E, Garcia-Planella E, Navarro M, Lorenzo-Zúñiga V, Cabré E, and Gassull MA (2006). Predictors of clinical response to systemic steroids in active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 51(8):1434–1438.
57. Berns A, Rubinfeld S, Rymzo WT, and Calabro JJ (1972). Hazard of combining allopurinol and thiopurine. *N. Engl. J. Med.* 286(13):730–731.
58. Bernstein CN, El-Gabalawy H, Sargent M, Landers C, Rawsthorne P, Elias B, and Targan SR (2011). Assessing inflammatory bowel disease-associated antibodies in Caucasian and First Nations cohorts. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 25(5):269–273.
59. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, and Kern F Jr (1976). Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70(3):439–444.
60. Blaker PA, Arenas M, Fairbanks L, Irving PM, Marinaki AM, and Sanderson JI (2011). A Biochemical Mechanism for the Role of Allopurinol in TPMT Inhibition. *Gastroenterology* 140(5):S769–S769.
61. **Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Smith MA, Shobowale-Bakre EA, Fairbanks L, Irving PM, Sanderson JD, and Marinaki AM (2013). Mechanism of allopurinol induced TPMT inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 86(4):539–547.**
62. Bo J, Schrøder H, Kristinsson J, Madsen B, Szumlanski C, Weinshilboum R, Andersen JB, and Schmiegelow K (1999). Possible carcinogenic effect of 6-mercaptopurine on bone marrow stem cells: relation to thiopurine metabolism. *Cancer* 86(6):1080–1086.
63. Van Bodegraven AA, and Mulder CJJ (2006). Indications for 5-aminosalicylate in inflammatory bowel disease: is the body of evidence complete? *World J. Gastroenterol. WJG* 12(38):6115–6123.
64. Bodenreider O, Nelson SJ, Hole WT, and Chang HF (1998). Beyond synonymy: exploiting the UMLS semantics in mapping vocabularies. *Proc. AMIA Annu. Symp. AMIA Symp.* 815–819.
65. De Boer NKH, Mulder CJJ, and van Bodegraven AA (2005). Myelotoxicity and hepatotoxicity during azathioprine therapy. *Neth. J. Med.* 63(11):444–446.
66. **De Boer NKH, Wong DR, Jharap B, de Graaf P, Hooymans PM, Mulder CJJ, Rijmen F, Engels LGJB, and van Bodegraven AA (2007). Dose-dependent influence of 5-aminosalicylates on thiopurine metabolism. *Am. J. Gastroenterol.* 102(12):2747–2753.**
67. Bogni A, Cheng C, Liu W, Yang W, Pfeffer J, Mukatira S, French D, Downing JR, Pui C-H, and Relling MV (2006). Genome-wide approach to identify risk factors for therapy-related myeloid leukemia. *Leukemia* 20(2):239–246.
68. **Bonaz B, Boitard J, Marteau P, Lémann M, Coffin B, Flourié B, Belaiche J, Cadiot G, Metman E-H, Cortot A, et al. (2003). Tioguanine in patients with Crohn's disease intolerant or resistant to azathioprine/mercaptopurine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18(4):401–408.**
69. **Booth RA, Ansari MT, Loit E, Tricco AC, Weeks L, Doucette S, Skidmore B, Sears M, Sy R, and Karsh J (2011). Assessment of thiopurine s-methyltransferase activity in patients prescribed thiopurines: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 154(12):814–823.**
70. Boulton-Jones JR, Pritchard K, and Mahmoud AA (2000). The use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease after failure of azathioprine therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14(12):1561–1565.
71. Bowen DG, and Selby WS (2000). Use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease previously intolerant of azathioprine. *Dig. Dis. Sci.* 45(9):1810–1813.
72. Bowen GE, Irons GV, Rhodes JB, and Kirsner JB (1966). Early experiences with azathioprine in ulcerative colitis; a note of caution. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 195(6):460–464.
73. Bowton E, Field JR, Wang S, Schildcrout JS, Van Driest SL, Delaney JT, Cowan J, Weeke P, Mosley JD, Wells QS, et al. (2014). Biobanks and electronic medical records: enabling cost-effective research. *Sci. Transl. Med.* 6(234):234cm3.

74. Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, and Hayes PC (2005). Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 11(7):826–833.
75. Brennan EP, Ehrich M, Brazil DP, Crean JK, Murphy M, Sadlier DM, Martin F, Godson C, McKnight AJ, van den Boom D, et al. (2009). Comparative analysis of DNA methylation profiles in peripheral blood leukocytes versus lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 4(3):159–164.
76. Bronk JR, Lister N, and Shaw MI (1988). Transport and metabolism of 6-thioguanine and 6-mercaptopurine in mouse small intestine. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 74(6):629–638.
77. Brouwer C, De Abreu RA, Keizer-Garritsen JJ, Lambooy LHJ, Ament K, ter Riet PGJH, van Wering ER, Trijbels FJM, Veerman AJP, Hoogerbrugge PM, et al. (2005). Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukaemia: biochemical and molecular biological aspects. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 41(4):613–623.
78. De Brouwer APM, van Bokhoven H, and Kremer H (2006). Comparison of 12 reference genes for normalization of gene expression levels in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines and fibroblasts. *Mol. Diagn. Ther.* 10(3):197–204.
79. Brown CC, Havener TM, Medina MW, Jack JR, Krauss RM, McLeod HL, and Motsinger-Reif AA (2014). Genome-wide Association and Pharmacological Profiling of 29 Anticancer Agents Using Lymphoblastoid Cell Lines. *Pharmacogenomics* 15(2):137–146.
80. Brynskov J, Freund L, Rasmussen SN, Lauritsen K, de Muckadell OS, Williams N, MacDonald AS, Tanton R, Molina F, and Campanini MC (1989). A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 321(13):845–850.
81. Burke DA, Dixon MF, and Axon AT (1989). Ulcerative colitis: prolonged remission following azathioprine-induced pancytopenia. *J. Clin. Gastroenterol.* 11(3):327–330.
82. Burri E, and Beglinger C (2011). Faecal calprotectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Biochem. Medica* 21(3):245–253.
83. Buster EHCJ, van Vuuren HJ, Zondervan PE, Metselaar HJ, Tilanus HW, and de Man RA (2008). Thiopurine-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphism in a liver transplant recipient developing nodular regenerative hyperplasia on low-dose azathioprine. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20(1):68–72.



## - C -

84. Caliskan M, Cusanovich DA, Ober C, and Gilad Y (2011). The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profiles. *Hum. Mol. Genet.* 20(8):1643–1652.
85. Campbell S, Kingstone K, and Ghosh S (2002). Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients maintained on low-dose azathioprine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16(3):389–398.
86. **Cann HM, de Toma C, Cazes L, Legrand M-F, Morel V, Piouffre L, Bodmer J, Bodmer WF, Bonne-Tamir B, Cambon-Thomsen A, et al. (2002). A human genome diversity cell line panel. *Science* 296(5566):261–262.**
87. Cappellini MD, and Fiorelli G (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 371(9606):64–74.
88. Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteo M, Hinojosa J, García-Paredes J, and Guijarro LG (2004). Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 10(11):RA247–254.
89. Carl B, Kroll H, Bux J, Bein G, and Santoso S (2000). B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping. *Transfusion (Paris)* 40(1):62–68.
90. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, and Alving AS (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124(3220):484–485.
91. Caudle KE, Klein TE, Hoffman JM, Muller DJ, Whirl-Carrillo M, Gong L, McDonagh EM, Sangkuhl K, Thorn CF, Schwab M, et al. (2014). Incorporation of pharmacogenomics into routine clinical practice: the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline development process. *Curr. Drug Metab.* 15(2):209–217.
92. Chalmers AH (1974). Studies on the mechanism of formation of 5-mercapto-1-methyl-4-nitroimidazole, a metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. *Biochem. Pharmacol.* 23(13):1891–1901.
93. Chan GL, Erdmann GR, Gruber SA, Matas AJ, and Canafax DM (1990). Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid and 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J. Clin. Pharmacol.* 30(4):358–363.
94. Chande N, Tsoulis DJ, and MacDonald JK (2013). Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4:CD000545.
95. Chaparro M, Ordás I, Cabré E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Peñalva M, Gomollón F, García-Planella E, Merino O, Gutiérrez A, et al. (2013). Safety of Thiopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Long-term Follow-up Study of 3931 Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 19(7):1404–1410.
96. Check Hayden E (2014). Technology: The \$1,000 genome. *Nature* 507(7492):294–295.
97. Chen Y-P, Lin H-J, Chen J-S, Tsai M-Y, Hsieh H-P, Chang J-Y, Chen N-F, Chang K-C, Huang W-T, Su W-C, et al. (2014). CDKN1A-mediated responsiveness of MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia to Aurora kinase-A inhibitors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 135(3):751–762.
98. **Cheung S-T, and Allan RN (2003). Mistaken identity: misclassification of TPMT phenotype following blood transfusion. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15(11):1245–1247.**
99. Cheung VG, Conlin LK, Weber TM, Arcaro M, Jen K-Y, Morley M, and Spielman RS (2003). Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat. Genet.* 33(3):422–425.
100. Chocair P, Duley J, Simmonds HA, Cameron JS, Ianhez L, Arap S, and Sabbaga E (1993). Low-dose allopurinol plus azathioprine/cyclosporin/prednisolone, a novel immunosuppressive regimen. *Lancet* 342(8863):83–84.
101. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, and Cameron JS (1992). The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplantation* 53(5):1051–1056.
102. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient M-A, and Roblin X (2012a). Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(1):15–36.
103. Chouchana L, Narjoz C, and Lorient M-A (2012b). TPMT status determination: The simplest is the most effective? *J. Crohns Colitis* 6(7):807.

Note : références majeures en gras

104. Chouchana L, Roche D, Jian R, Beaune P, and Lorient M-A (2013). Poor response to thiopurine in inflammatory bowel disease: how to overcome therapeutic resistance? *Clin. Chem.* 59(7):1023–1026.
105. Chouchana L, Narjoz C, Roche D, Golmard J-L, Pineau B, Chatellier G, Beaune P, and Lorient M-A (2014). Interindividual variability in TPMT enzyme activity: 10 years of experience with thiopurine pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *Pharmacogenomics* 15(6):745–757.
- 106. Choy E, Yelensky R, Bonakdar S, Plenge RM, Saxena R, De Jager PL, Shaw SY, Wolfish CS, Slavik JM, Cotsapas C, et al. (2008). Genetic analysis of human traits in vitro: drug response and gene expression in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Genet.* 4(11):e1000287.**
107. Chung W-H, Hung S-I, Hong H-S, Hsieh M-S, Yang L-C, Ho H-C, Wu J-Y, and Chen Y-T (2004). Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 428(6982):486.
108. Ciaccio MF, Wagner JP, Chu C-P, Lauffenburger DA, and Jones RB (2010). Systems analysis of EGF receptor signaling dynamics with microwestern arrays. *Nat. Methods* 7(2):148–155.
109. Citterio-Quentin A, Salvi J-P, and Bouliou R (2012). Determination of inosine triphosphate pyrophosphatase phenotype in human red blood cells using HPLC. *Ther. Drug Monit.* 34(4):477–480.
110. Citterio-Quentin A, Long S, Salvi J-P, Moulsmas M, and Bouliou R (2014). Determination of Inosine Triphosphate Pyrophosphatase in red blood cells using HPLC: An improved method. *Ther. Drug Monit.*
111. Clark SL, Adkins DE, Aberg K, Hettima JM, McClay JL, Souza RP, and van den Oord EJCG (2012). Pharmacogenomic study of side-effects for antidepressant treatment options in STAR\*D. *Psychol. Med.* 42(6):1151–1162.
112. Clarke DA, Elion GB, Hitchings GH, and Stock CC (1958). Structure-activity relationships among purines related to 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* 18(4):445–456.
113. Cloos J, Nieuwenhuis EJ, Boomsma DI, Kuik DJ, van der Sterre ML, Arwert F, Snow GB, and Braakhuis BJ (1999). Inherited susceptibility to bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 91(13):1125–1130.
114. Cloos J, de Boer WPH, Snel MHJ, van den Ijssel P, Ylstra B, Leemans CR, Brakenhoff RH, and Braakhuis BJM (2006). Microarray analysis of bleomycin-exposed lymphoblastoid cells for identifying cancer susceptibility genes. *Mol. Cancer Res. MCR* 4(2):71–77.
115. Cohen D, Chumakov I, and Weissenbach J (1993). A first-generation physical map of the human genome. *Nature* 366(6456):698–701.
116. Colleoni L, Kapetis D, Maggi L, Camera G, Canioni E, Cavalcante P, Kerlero de Rosbo N, Baggi F, Antozzi C, Confalonieri P, et al. (2013). A new thiopurine S-methyltransferase haplotype associated with intolerance to azathioprine. *J. Clin. Pharmacol.* 53(1):67–74.
117. Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH, Sludden J, Collier DA, Li T, and McLeod HL (1999). The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 9(1):37–42.
118. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS, and US National Human Genome Research Institute (2003). A vision for the future of genomics research. *Nature* 422(6934):835–847.
- 119. Colombel JF, Ferrari N, Debuysere H, Marteau P, Gendre JP, Bonaz B, Soulé JC, Modigliani R, Touze Y, Catala P, et al. (2000). Genotypic analysis of thiopurine S-methyltransferase in patients with Crohn's disease and severe myelosuppression during azathioprine therapy. *Gastroenterology* 118(6):1025–1030.**
- 120. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, et al. (2010). Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 362(15):1383–1395.**
121. Colombel J-F, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J, Kent JD, et al. (2007). Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 132(1):52–65.
122. Colombel J-F, Sandborn WJ, Panaccione R, Robinson AM, Lau W, Li J, and Cardoso AT (2009). Adalimumab safety in global clinical trials of patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(9):1308–1319.
123. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, and Lennard-Jones JE (1993). Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 34(8):1081–1085.
- 124. Consortium T 1000 GP (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467(7319):1061–1073.**

Note : références majeures en gras



125. Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, Ritchie MD, Stein CM, Roden DM, Smith JD, et al. (2008a). A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood* 112(4):1022–1027.
126. Cooper SC, Ford LT, Berg JD, and Lewis MJV (2008b). Ethnic variation of thiopurine S-methyltransferase activity: a large, prospective population study. *Pharmacogenomics* 9(3):303–309.
127. Corominas H, Domènech M, González D, Diaz C, Roca M, García-González MA, Peña S, and Baiget M (2000). Allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase deficiency in patients with ulcerative colitis and in healthy controls. *Am. J. Gastroenterol.* 95(9):2313–2317.
- 128. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Tiret E, and Gendre J-P (2005). Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 54(2):237–241.**
129. Cotton SC, Sharp L, Little J, and Brockton N (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151(1):7–32.
130. Coulombe-Huntington J, Lam KCL, Dias C, and Majewski J (2009). Fine-scale variation and genetic determinants of alternative splicing across individuals. *PLoS Genet.* 5(12):e1000766.
- 131. Coulthard SA, Howell C, Robson J, and Hall AG (1998). The relationship between thiopurine methyltransferase activity and genotype in blasts from patients with acute leukemia. *Blood* 92(8):2856–2862.**
- 132. Coulthard SA, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CPF, Minto L, and Hall AG (2002). The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol. Pharmacol.* 62(1):102–109.**
133. Crosby WH (1956). Favism in Sardinia (newsletter). *Blood* 11(1):91–92.
- 134. Cuffari C, Théorêt Y, Latour S, and Seidman G (1996). 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 39(3):401–406.**
135. Cuffari C, Hunt S, and Bayless T (2001). Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 48(5):642–646.
136. Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, Thompson RE, and Bayless TM (2004). Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2(5):410–417.
137. Cuillerier E, Lémann M, Bouhnik Y, Allez M, Rambaud JC, and Modigliani R (2001). Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a retrospective study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(11):1291–1296.

**- D -**

138. D'Haens G (1999). Prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1(6):476-481.
139. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, and Rutgeerts P (1997). Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 112(5):1475-1481.
140. D'Haens G, Baert F, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Donner A, et al. (2008). Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 371(9613):660-667.
141. D'Haens GR, Fedorak R, Lémann M, Feagan BG, Kamm MA, Cosnes J, Rutgeerts PJ, Marteau P, Travis S, Schölmerich J, et al. (2009). Endpoints for clinical trials evaluating disease modification and structural damage in adults with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(10):1599-1604.
142. Daniel F, Cadranet J-F, Seksik P, Cazier A, Duong Van Huyen J-P, Ziol M, Coutarel P, Loison P, Jian R, and Marteau P (2005). Azathioprine induced nodular regenerative hyperplasia in IBD patients. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 29(5):600-603.
143. Dausset J, Cann H, Cohen D, Lathrop M, Lalouel JM, and White R (1990). Centre d'étude du polymorphisme humain (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome. *Genomics* 6(3):575-577.
144. Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, Van Loon J, Ferber W, and Weinshilboum RM (1994). Purine substrates for human thiopurine methyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* 48(11):2135-2138.
145. Denny ICD9 to PheWAS: Code translation map. Disponible sur : [http://knowledgegemap2.mc.vanderbilt.edu/research/sites/default/files/code\\_translation.txt](http://knowledgegemap2.mc.vanderbilt.edu/research/sites/default/files/code_translation.txt) [Accédé le :January 8, 2013].
- 146. Denny JC (2012). Chapter 13: Mining electronic health records in the genomics era. *PLoS Comput. Biol.* 8(12):e1002823.**
- 147. Denny JC, Ritchie MD, Basford MA, Pulley JM, Bastarache L, Brown-Gentry K, Wang D, Masys DR, Roden DM, and Crawford DC (2010). PheWAS: demonstrating the feasibility of a phenome-wide scan to discover gene-disease associations. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26(9):1205-1210.**
148. Denny JC, Crawford DC, Ritchie MD, Bielinski SJ, Basford MA, Bradford Y, Chai HS, Bastarache L, Zuvich R, Peissig P, et al. (2011). Variants near FOXE1 are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions: using electronic medical records for genome- and phenome-wide studies. *Am J Hum Genet* 89:529-542.
- 149. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Engels LGJB, Bos LP, Bus PJ, Lohman JJHM, Curvers WL, Van Deventer SJH, Hommes DW, and Hooymans PM (2004). Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Ther. Drug Monit.* 26(3):311-318.**
150. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, and Hommes DW (2006). Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(5):715-729.
- 151. Dervieux T, and Bouliou R (1998). Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. *Clin. Chem.* 44(3):551-555.**
- 152. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, and Relling MV (2001). Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res.* 61(15):5810-5816.**
153. Dervieux T, Hancock ML, Pui C-H, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Boyett J, Evans WE, and Relling MV (2003). Antagonism by methotrexate on mercaptopurine disposition in lymphoblasts during up-front treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 73(6):506-516.
154. Dervieux T, Meyer G, Barham R, Matsutani M, Barry M, Bouliou R, Neri B, and Seidman E (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin. Chem.* 51(11):2074-2084.
155. Dewit O, Starkel P, and Roblin X (2010). Thiopurine metabolism monitoring: implications in inflammatory bowel diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 40(11):1037-1047.

156. Dewit O, Moreels T, Baert F, Peeters H, Reenaers C, de Vos M, Van Hootegeem P, Muls V, Veereman G, Mana F, et al. (2011). Limitations of extensive TPMT genotyping in the management of azathioprine-induced myelosuppression in IBD patients. *Clin. Biochem.* 44(13):1062–1066.
157. DGOS (2014). Atlas des systèmes d'information hospitaliers 2014. Disponible sur : [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Atlas\\_des\\_SIH\\_2014-2.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Atlas_des_SIH_2014-2.pdf).
158. Van Dieren JM, van Vuuren AJ, Kusters JG, Nieuwenhuis EES, Kuipers EJ, and van der Woude CJ (2005). ITPA genotyping is not predictive for the development of side effects in AZA treated inflammatory bowel disease patients. *Gut* 54(11):1664.
159. Van Dieren JM, Hansen BE, Kuipers EJ, Nieuwenhuis EES, and Van der Woude CJ (2007). Meta-analysis: Inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphisms and thiopurine toxicity in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26(5):643–652.
160. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, et al. (2010). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J. Crohns Colitis* 4(1):28–62.
161. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel J-F, Allez M, D'Haens G, D'Hoore A, Mantzaris G, Novacek G, et al. (2012). Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J. Crohns Colitis* 6(10):991–1030.
162. Dilger K, Schaeffeler E, Lukas M, Strauch U, Herfarth H, Müller R, and Schwab M (2007). Monitoring of thiopurine methyltransferase activity in postsurgical patients with Crohn's disease during 1 year of treatment with azathioprine or mesalazine. *Ther. Drug Monit.* 29(1):1–5.
163. Ding L, Zhang F, Liu H, Gao X, Bi H, Wang X, Chen B, Zhang Y, Zhao L, Zhong G, et al. (2012). Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activity is related to 6-thioguanine nucleotide concentrations and thiopurine-induced leukopenia in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18(1):63–73.
164. Domènech E, Nos P, Papo M, López-San Román A, Garcia-Planella E, and Gassull MA (2005). 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease and previous digestive intolerance of azathioprine. *Scand. J. Gastroenterol.* 40(1):52–55.
165. Donnan JR, Ungar WJ, Mathews M, Hancock-Howard RL, and Rahman P (2011). A cost effectiveness analysis of thiopurine methyltransferase testing for guiding 6-mercaptopurine dosing in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 57(2):231–239.
166. Doré M, Frenette AJ, Mansour A-M, Troyanov Y, and Bégin J (2014). Febuxostat as a novel option to optimize thiopurines' metabolism in patients with inadequate metabolite levels. *Ann. Pharmacother.* 48(5):648–651.
167. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, and Seidman EG (2000). Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118(4):705–713.
168. Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, and Vasiliauskas EA (2001). An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* 7(3):181–189.
169. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, and Vasiliauskas EA (2002). 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(4):904–915.
170. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, Abreu MT, Papadakis KA, Tran T, Martin P, Vierling JM, Geller SA, Targan SR, et al. (2003a). 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 125(2):298–303.
171. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, Targan SR, and Vasiliauskas EA (2003b). Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. *Am. J. Gastroenterol.* 98(5):1058–1063.
172. Duley JA, Chocair PR, and Florin THJ (2005). Observations on the use of allopurinol in combination with azathioprine or mercaptopurine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(11-12):1161–1162.
173. Dunnett CW (1955). A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50(272):1096–1121.

Note : références majeures en gras

**- E - F -**

174. Eadon MT, Wheeler HE, Stark AL, Zhang X, Moen EL, Delaney SM, Im HK, Cunningham PN, Zhang W, and Dolan ME (2013). Genetic and epigenetic variants contributing to clofarabine cytotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 22(19):4007–4020.
- 175. Van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, and Barclay ML (2012). High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(10):1181–1189.**
176. Van Egmond R, Barclay ML, Chin PKL, Sies CW, and Florkowski CM (2013). Biological variation of thiopurine methyltransferase enzyme activity: when has a significant change taken place? *Ann. Clin. Biochem.* 50(Pt 5):473–478.
177. Eklund BI, and Mannervik B (2007). Importance of a hypervariable active-site residue in human Mu class glutathione transferases catalyzing the bioactivation of chemotherapeutic thiopurine prodrugs. *Biochim. Biophys. Acta* 1770(8):1098–1103.
178. Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, and Mannervik B (2006). Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.* 70(2):747–754.
- 179. Elion GB (1967). Symposium on immunosuppressive drugs. Biochemistry and pharmacology of purine analogues. *Fed. Proc.* 26(3):898–904.**
180. Elion GB (1972). Significance of azathioprine metabolites. *Proc. R. Soc. Med.* 65(3):257–260.
181. Elion GB (1989). The purine path to chemotherapy. *Science* 244(4900):41–47.
182. Elion GB (1993). The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 685:400–407.
183. Elion GB, Hitchings GH, and Vanderwerff H (1951). Antagonists of nucleic acid derivatives. VI. Purines. *J. Biol. Chem.* 192(2):505–518.
184. El-Matary W, Vandermeer B, and Griffiths AM (2009). Methotrexate for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (3):CD007560.
185. EMA (2008). Refus d'autorisation de mise sur le marché du produit Cimzia (certolizumab pegol). Disponible sur : [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/000740/WC500070614.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000740/WC500070614.pdf) [Accédé le :June 8, 2014].
186. EMA (2012a). Résumé des caractéristiques du produit Remicade (infliximab). Disponible sur : [http://www.emea.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000240/WC500050888.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf) [Accédé le :January 25, 2013].
187. EMA (2012b). Résumé des caractéristiques du produit Xaluprine (6-mercaptopurine). Disponible sur : [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002022/WC500124645.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002022/WC500124645.pdf) [Accédé le :August 24, 2014].
188. EMA (2013). Résumé des caractéristiques du produit Humira (adalimumab). Disponible sur : [http://www.emea.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000481/WC500050870.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf) [Accédé le :January 25, 2013].
189. EMA (2014a). Résumé des caractéristiques du produit Simponi (golimumab). Disponible sur : [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000992/WC500052368.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000992/WC500052368.pdf) [Accédé le :August 30, 2014].
190. EMA (2014b). Résumé des caractéristiques du produit Cimzia (certolizumab pegol). Disponible sur : [http://www.ema.europa.eu/docs/fr\\_FR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001037/WC500069763.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001037/WC500069763.pdf) [Accédé le :June 8, 2014].
191. Epstein M, and Barr Y (1964). Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* 1(7327):252–253.
192. Erdmann GR, France LA, Bostrom BC, and Canafax DM (1990). A reversed phase high performance liquid chromatography approach in determining total red blood cell concentrations of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, methylthioguanine, and methylmercaptopurine in a patient receiving thiopurine therapy. *Biomed. Chromatogr. BMC* 4(2):47–51.
193. Etienne-Manneville S, and Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629–635.
- 194. Evans WE, and Relling MV (1999). Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* 286(5439):487–491.**

Note : références majeures en gras

195. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, and Roberts WM (1991). Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* 119(6):985–989.
- 196. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, Kalwinsky D, Keller F, Khatib Z, Margolin J, et al. (2001). Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19(8):2293–2301.**
197. Fairchild CR, Maybaum J, and Kennedy KA (1986). Concurrent unilateral chromatid damage and DNA strand breakage in response to 6-thioguanine treatment. *Biochem. Pharmacol.* 35(20):3533–3541.
198. Farfan MJ, Salas C, Canales C, Silva F, Villarroel M, Kopp K, Torres JP, Santolaya ME, and Morales J (2014). Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* 14(1):299.
199. FDA (2011). Summary of Product Characteristics: Imuran®. Disponible sur : [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/016324s034s0351bl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/016324s034s0351bl.pdf) [Accédé le : July 25, 2011].
200. Feagan BG, and Macdonald JK (2012). Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 10:CD000543.
201. Feagan BG, McDonald JW, Rochon J, Laupacis A, Fedorak RN, Kinnear D, Saibil F, Groll A, Archambault A, and Gillies R (1994). Low-dose cyclosporine for the treatment of Crohn's disease. The Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Investigators. *N. Engl. J. Med.* 330(26):1846–1851.
202. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Gillies R, and Hopkins M (1995). Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* 332(5):292–297.
203. Feero WG, Guttmacher AE, and Collins FS (2010). Genomic medicine--an updated primer. *N. Engl. J. Med.* 362(21):2001–2011.
204. Feng Q, Vannaprasaht S, Peng Y, Angsuthum S, Avihingsanon Y, Yee VC, Tassaneeyakul W, and Weinshilboum RM (2010). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme. *Biochem. Pharmacol.* 79(7):1053–1061.
205. Feng W, Hong G, Delecluse H-J, and Kenney SC (2004). Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J. Virol.* 78(4):1893–1902.
206. Ferrante M, Vermeire S, Katsanos KH, Noman M, Van Assche G, Schnitzler F, Arijs I, De Hertogh G, Hoffman I, Geboes JK, et al. (2007). Predictors of early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(2):123–128.
207. Fink D, Aebi S, and Howell SB (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 4(1):1–6.
208. Ford AC, Achkar J-P, Khan KJ, Kane SV, Talley NJ, Marshall JK, and Moayyedi P (2011). Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106(4):601–616.
209. Fotoohi AK, Lindqvist M, Peterson C, and Albertioni F (2006). Involvement of the concentrative nucleoside transporter 3 and equilibrative nucleoside transporter 2 in the resistance of T-lymphoblastic cell lines to thiopurines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(1):208–215.
210. Frankovich J, Longhurst CA, and Sutherland SM (2011). Evidence-based medicine in the EMR era. *N. Engl. J. Med.* 365(19):1758–1759.
211. Fraser AG (2003). Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15(3):225–231.
212. Fraser AG, Orchard TR, and Jewell DP (2002). The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 50(4):485–489.
213. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, et al. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164):851–861.
- 214. Fridley BL, Batzler A, Li L, Li F, Matimba A, Jenkins GD, Ji Y, Wang L, and Weinshilboum RM (2011). Gene set analysis of purine and pyrimidine antimetabolites cancer therapies. *Pharmacogenet. Genomics* 21(11):701–712.**

Note : références majeures en gras

- 215. Friedman AB, Sparrow MP, and Gibson PR (2012). Why thiopurine metabolites are relevant. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 35(3):400–401.
- 216. Frisan T, Levitsky V, and Masucci M (2001). Generation of lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 174:125–127.
- 217. Fu R, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Larovere LE, Yamada Y, Nguyen KV, Hegde M, Visser JE, Schretlen DJ, Nyhan WL, et al. (2014). Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain J. Neurol.* 137(Pt 5):1282–1303.



## - G -

218. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, and Jacqz-Aigrain E (2004). Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 60(2):89-96.
219. Garat A, Cauffiez C, Renault N, Lo-Guidice JM, Allorge D, Chevalier D, Houdret N, Chavatte P, Lorient MA, Gala JL, et al. (2008). Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochem. Pharmacol.* 76(3):404-415.
220. Gardiner SJ, Gearry RB, Barclay ML, and Begg EJ (2006). Two cases of thiopurine methyltransferase (TPMT) deficiency--a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62(4):473-476.
221. Gardiner SJ, Gearry RB, Begg EJ, Zhang M, and Barclay ML (2008). Thiopurine dose in intermediate and normal metabolizers of thiopurine methyltransferase may differ three-fold. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6(6):654-660.
222. Gardiner SJ, Gearry RB, Burt MJ, Chalmers-Watson T, Chapman BA, Ross AG, Stedman CAM, Huelsen A, and Barclay ML (2011). Allopurinol might improve response to azathioprine and 6-mercaptopurine by correcting an unfavorable metabolite ratio. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26(1):49-54.
223. Garrod AE (1902). The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 160(4137):1616-1620.
224. Gearry RB, Roberts RL, Barclay ML, and Kennedy MA (2004). Lack of association between the ITPA 94C>A polymorphism and adverse effects from azathioprine. *Pharmacogenetics* 14(11):779-781.
225. Gearry RB, Day AS, Barclay ML, Leong RWL, and Sparrow MP (2010). Azathioprine and allopurinol: A two-edged interaction. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25(4):653-655.
226. Gensburger O, Van Schaik RHN, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard J-B, Van Gelder T, and Marquet P (2010). Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet. Genomics* 20(9):537-543.
227. Gervasini G, Benítez J, and Carrillo JA (2010). Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66(8):755-774.
228. Giacomini KM, Yee SW, Ratain MJ, Weinshilboum RM, Kamatani N, and Nakamura Y (2012). Pharmacogenomics and patient care: one size does not fit all. *Sci. Transl. Med.* 4(153):153ps18.
229. Gilissen LPL, Derijks LJJ, Bos LP, Verhoeven HMJM, Bus PJ, Hooymans PM, and Engels LGJB (2004). Some cases demonstrating the clinical usefulness of therapeutic drug monitoring in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 16(7):705-710.
230. Gilissen LPL, Derijks LJJ, Verhoeven HMJH, Bierau J, Hooymans PM, Hommes DW, and Engels LGJB (2007). Pancytopenia due to high 6-methylmercaptopurine levels in a 6-mercaptopurine treated patient with Crohn's disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 39(2):182-186.
231. Gilissen LPL, Wong DR, Engels LGJB, Bierau J, Bakker JA, Paulussen ADC, Romberg-Camps MJ, Stronkhorst A, Bus P, Bos LP, et al. (2012). Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy. *J. Crohns Colitis* 6(6):698-707.
232. Gipps EM, and Kidson C (1984). Cellular radiosensitivity: expression of an MS susceptibility gene? *Neurology* 34(6):808-811.
233. Gisbert JP, and Gomollón F (2008). Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am. J. Gastroenterol.* 103(7):1783-1800.
234. Gisbert JP, Gomollón F, Cara C, Luna M, Yago González-Lama, Pajares JM, Maté J, and Guijarro LG (2007a). Thiopurine methyltransferase activity in Spain: a study of 14,545 patients. *Dig. Dis. Sci.* 52(5):1262-1269.
235. Gisbert JP, González-Lama Y, and Maté J (2007b). Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am. J. Gastroenterol.* 102(7):1518-1527.
236. Gisbert JP, Luna M, González-Lama Y, Pousa ID, Velasco M, Moreno-Otero R, and Maté J (2007c). Liver injury in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 786 patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(9):1106-1114.

Note : références majeures en gras

237. Gisbert JP, McNicholl AG, and Gomollon F (2009). Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(11):1746–1754.
238. Glaab WE, Risinger JJ, Umar A, Barrett JC, Kunkel TA, and Tindall KR (1998). Resistance to 6-thioguanine in mismatch repair-deficient human cancer cell lines correlates with an increase in induced mutations at the HPRT locus. *Carcinogenesis* 19(11):1931–1937.
239. Gold DM, Levine JJ, Weinstein TA, Kessler B, and Pettei MJ (1995). Prolonged medical therapy for severe pediatric ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 90(5):732–735.
240. Goldenberg BA, Rawsthorne P, and Bernstein CN (2004). The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 99(9):1744–1748.
241. Goldstein DB, Tate SK, and Sisodiya SM (2003). Pharmacogenetics goes genomic. *Nat. Rev. Genet.* 4(12):937–947.
242. Goldstein E, Marion J, Wheeler S, and Present D (1998). 6-Mercaptopurine (6-MP): Does it increase or decrease the risks of colon cancer in Crohn's disease (CD)? *Gastroenterology* 114(Supplement 1):A986.
243. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, and Meyer UA (1988). Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331(6155):442–446.
- 244. González-Lama Y, Bermejo F, López-Sanromán A, García-Sánchez V, Esteve M, Cabriada JL, McNicholl AG, Pajares R, Casellas F, Merino O, et al. (2011). Thiopurine methyl-transferase activity and azathioprine metabolite concentrations do not predict clinical outcome in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34(5):544–554.**
245. Gottesman O, Kuivaniemi H, Tromp G, Faucett WA, Li R, Manolio TA, Sanderson SC, Kannry J, Zinberg R, Basford MA, et al. (2013). The Electronic Medical Records and Genomics (eMERGE) Network: past, present, and future. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 15(10):761–771.
- 246. De Graaf P, de Boer NKH, Wong DR, Karner S, Jharap B, Hooymans PM, Veldkamp AI, Mulder CJJ, van Bodegraven AA, and Schwab M (2010). Influence of 5-aminosalicylic acid on 6-thioguanosine phosphate metabolite levels: a prospective study in patients under steady thiopurine therapy. *Br. J. Pharmacol.* 160(5):1083–1091.**
247. Gupta P, Gokhale R, and Kirschner BS (2001). 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 33(4):450–454.
- 248. Gurwitz D (2013). Expression profiling: a cost-effective biomarker discovery tool for the personal genome era. *Genome Med.* 5(5):41.**
- 249. Gurwitz D, and McLeod HL (2013). Genome-wide studies in pharmacogenomics: harnessing the power of extreme phenotypes. *Pharmacogenomics* 14(4):337–339.**
250. Gurwitz D, Kimchi O, and Bonne-Tamir B (2003). The Israeli DNA and Cell Line Collection: A Human Diversity Repository. In *Populations and Genetics : Legal and Socio-Ethical Perspectives*, (Leiden, The Netherlands: Martinus Nijhoff), pp. 95–113.
251. Gurwitz D, Rodríguez-Antona C, Payne K, Newman W, Gisbert JP, de Mesa EG, and Ibarreta D (2009). Improving pharmacovigilance in Europe: TPMT genotyping and phenotyping in the UK and Spain. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17(8):991–998.



**- H -**

252. Haber CJ, Meltzer SJ, Present DH, and Korelitz BI (1986). Nature and course of pancreatitis caused by 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 91(4):982-986.
253. Al Hadithy AFY, de Boer NKH, Derijks LJJ, Escher JC, Mulder CJJ, and Brouwers JRB (2005). Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 37(4):282-297.
254. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, and Almer S (2008). IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease - relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 65(1):69-77.
255. Halevy A, Norvig P, and Pereira F (2009). The Unreasonable Effectiveness of Data. *IEEE Intell. Syst.* 24(2):8-12.
256. Hamdan-Khalil R, Allorge D, Lo-Guidice J-M, Cauffiez C, Chevalier D, Spire C, Houdret N, Libersa C, Lhermitte M, Colombel J-F, et al. (2003). In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309(4):1005-1010.
257. Hamdan-Khalil R, Gala J-L, Allorge D, Lo-Guidice J-M, Horsmans Y, Houdret N, and Broly F (2005). Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT\*16 and TPMT\*19. *Biochem. Pharmacol.* 69(3):525-529.
258. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS-E, and Mizugaki M (2003). Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 55(6):560-569.
259. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Arai O, Watanabe F, Abe J, Maruyama Y, Oohata A, Ikeya K, Kageoka M, et al. (2010). Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide. *Inflamm. Bowel Dis.* 16(8):1376-1381.
260. Hanauer SB, and Strömberg U (2004). Oral Pentasa in the treatment of active Crohn's disease: A meta-analysis of double-blind, placebo-controlled trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2(5):379-388.
261. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, and Pollack P (2006). Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 130(2):323-333; quiz 591.
262. Hande S, Wilson-Rich N, Bousvaros A, Zholudev A, Maurer R, Banks P, Makrauer F, Reddy S, Burakoff R, and Friedman S (2006). 5-aminosalicylate therapy is associated with higher 6-thioguanine levels in adults and children with inflammatory bowel disease in remission on 6-mercaptopurine or azathioprine. *Inflamm. Bowel Dis.* 12(4):251-257.
263. Hansen NT, Brunak S, and Altman RB (2009). Generating genome-scale candidate gene lists for pharmacogenomics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 86(2):183-189.
- 264. Hartford C, Vasquez E, Schwab M, Edick MJ, Rehge JE, Grosveld G, Pui C-H, Evans WE, and Relling MV (2007). Differential effects of targeted disruption of thiopurine methyltransferase on mercaptopurine and thioguanine pharmacodynamics. *Cancer Res.* 67(10):4965-4972.**
265. Hartford CM, Duan S, Delaney SM, Mi S, Kistner EO, Lamba JK, Huang RS, and Dolan ME (2009). Population-specific genetic variants important in susceptibility to cytarabine arabinoside cytotoxicity. *Blood* 113(10):2145-2153.
266. Hartman SC, and Buchanan JM (1959). Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis). *Annu. Rev. Biochem.* 28:365-410.
267. Hartsink-Segers SA, Beaudoin JJ, Luijendijk MWJ, Exalto C, Pieters R, and Den Boer ML (2014). PKC $\zeta$  and PKM $\zeta$  are overexpressed in TCF3-rearranged paediatric acute lymphoblastic leukaemia and are associated with increased thiopurine sensitivity. *Leukemia*.
268. Harvey R, and Bradshaw J (1980). A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* 315(8167):514.
269. Hashash JG, and Binion DG (2014). Managing *Clostridium difficile* in Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Curr. Gastroenterol. Rep.* 16(7):393.
270. Hassoun BS, Palmer IS, and Dwivedi C (1995). Selenium detoxification by methylation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 90(1):133-142.

271. Hawthorne VS, Huang W-C, Neal CL, Tseng L-M, Hung M-C, and Yu D (2009). ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 7(4):592–600.
272. Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Vandenbroeck K, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, Collins J, Rodgers C, and McElnay JC (2008). Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 66(4):517–528.
273. Heap G, Singh A, Bewshea C, Weedon M, Cole A, Creed T, Greig E, Irving P, Lindsay J, Mawdsley J, et al. (2014). OC-004 Thiopurine Induced Pancreatitis In Inflammatory Bowel Disease: Clinical Features And Genetic Determinants. *Gut* 63 Suppl 1:A2–3.
274. Hebrbring SJ, Schrodi SJ, Ye Z, Zhou Z, Page D, and Brilliant MH (2013). A PheWAS approach in studying HLA-DRB1\*1501. *Genes Immun.*
275. Herrlinger KR, Schwab M, Fellermann K, and Stange EF (2004). 6-thioguanine-buried alive? *Gastroenterology* 126(3):940–941; author reply 941–942.
276. Herting G, Barber K, Zappala MR, Cunningham RP, and Burgis NE (2010). Quantitative in vitro and in vivo characterization of the human P32T mutant ITPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1802(2):269–274.
277. Higgins PDR, Schwartz M, Mapili J, and Zimmermann EM (2005). Is endoscopy necessary for the measurement of disease activity in ulcerative colitis? *Am. J. Gastroenterol.* 100(2):355–361.
278. Higgs JE, Payne K, Roberts C, and Newman WG (2010). Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics* 11(2):177–188.
279. Hindorf U, and Appell ML (2012). Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J. Crohns Colitis* 6(6):655–659.
280. Hindorf U, Peterson C, and Almer S (2004). Assessment of thiopurine methyltransferase and metabolite formation during thiopurine therapy: results from a large Swedish patient population. *Ther. Drug Monit.* 26(6):673–678.
- 281. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Söderkvist P, Ström M, Hjortswang H, Pousette A, and Almer S (2006a). Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 55(10):1423–1431.**
- 282. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, and Almer S (2006b). Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(2):331–342.**
283. Hindorf U, Johansson M, Eriksson A, Kvifors E, and Almer SHC (2009). Mercaptopurine treatment should be considered in azathioprine intolerant patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 29(6):654–661.
284. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, and Manolio TA (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U A* 106:9362–9367.
285. Hindorff LA, MacArthur J (European Bioinformatics Institute), Morales J (European Bioinformatics Institute), Junkins HA, Hall PN, Klemm AK, and Manolio TA A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Disponible sur : <http://www.genome.gov/gwastudies/> [Accédé le :April 9, 2013].
286. Hobara N, and Watanabe A (1981). Impaired metabolism of azathioprine in carbon tetrachloride-injured rats. *Hepatogastroenterology.* 28(4):192–194.
287. Hoentjen F, Hanauer SB, de Boer NK, and Rubin DT (2012). Two brothers with skewed thiopurine metabolism in ulcerative colitis treated successfully with allopurinol and mercaptopurine dose reduction. *Dig. Dis. Sci.* 57(1):250–253.
288. Holmes SL, Turner BM, and Hirschhorn K (1979). Human inosine triphosphatase: catalytic properties and population studies. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 97(2-3):143–153.
289. Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, and Evans WE (1999). Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum. Mol. Genet.* 8(2):371–376.
290. Hosni-Ahmed A, Barnes JD, Wan J, and Jones TS (2011). Thiopurine methyltransferase predicts the extent of cytotoxicity and DNA damage in astroglial cells after thioguanine exposure. *PloS One* 6(12):e29163.

291. Hsieh MM, Everhart JE, Byrd-Holt DD, Tisdale JF, and Rodgers GP (2007). Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences. *Ann. Intern. Med.* 146(7):486–492.
292. Hu VW, Frank BC, Heine S, Lee NH, and Quackenbush J (2006). Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC Genomics* 7:118.
293. Huang DW, Sherman BT, and Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4(1):44–57.
294. Huang RS, Duan S, Bleibel WK, Kistner EO, Zhang W, Clark TA, Chen TX, Schweitzer AC, Blume JE, Cox NJ, et al. (2007). A genome-wide approach to identify genetic variants that contribute to etoposide-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(23):9758–9763.
295. Huang RS, Duan S, Kistner EO, Hartford CM, and Dolan ME (2008). Genetic variants associated with carboplatin-induced cytotoxicity in cell lines derived from Africans. *Mol. Cancer Ther.* 7(9):3038–3046.
296. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, and Schmidt LH (1954). Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am. Rev. Tuberc.* 70(2):266–273.
297. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O’Morain CA, Gassull M, et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411(6837):599–603.
298. Huh K, Yamamoto I, Gohda E, and Iwata H (1976). Tissue distribution and characteristics of xanthine oxidase and allopurinol oxidizing enzyme. *Jpn. J. Pharmacol.* 26(6):719–724.
299. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, and Boyle JT (1991). Development and validation of a pediatric Crohn’s disease activity index. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 12(4):439–447.
300. Hyslop RM, and Jardine I (1981). Metabolism of 6-thiopurines. II. Covalent binding of a 6-thiopurine metabolite to mammalian tissue protein in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218(3):629–635.

**- I - J - K -**

301. IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2005). Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41(1):1-7.
302. Imray FP, Smith PJ, Relf W, and Kidson C (1984). Wilms' tumour: association with cellular sensitivity to mitomycin C in patients and first-degree relatives. *Lancet* 1(8387):1148-1151.
303. Inaba H, Greaves M, and Mullighan CG (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381(9881):1943-1955.
304. INCa (2014). Plan cancer 2014-2019. Guérir et prévenir les cancers: donnons les mêmes chances à tous, partout en France. Disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/publications/93-plan-cancer/762-plan-cancer-2014-2019> [Accédé le : August 20, 2014].
305. International Cancer Genome Consortium, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, Bhan MK, Calvo F, Eerola I, et al. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature* 464(7291):993-998.
- 306. International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426(6968):789-796.**
307. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee M-TM, Limdi NA, Page D, Roden DM, et al. (2009). Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N. Engl. J. Med.* 360(8):753-764.
308. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, Kinnear D, Saibil F, and McDonald JW (1994). Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. *Gastroenterology* 106(2):287-296.
309. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramírez J, Karrison T, Fleming GF, Vokes EE, Schilsky RL, and Ratain MJ (2002). UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J.* 2(1):43-47.
310. Izraeli S, Shochat C, Tal N, and Geron I (2014). Towards precision medicine in childhood leukemia--insights from mutationally activated cytokine receptor pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 352(1):15-20.
311. Janke D, Mehralivand S, Strand D, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Gradhand U, Fischer C, Toliat MR, Fritz P, Zanger UM, et al. (2008). 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. *Hum. Mutat.* 29(5):659-669.
312. Jeon J-P, Shim S-M, Nam H-Y, Baik S-Y, Kim J-W, and Han B-G (2007). Copy number increase of 1p36.33 and mitochondrial genome amplification in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 173(2):122-130.
313. Jeon J-P, Kim J-W, Park B, Nam H-Y, Shim S-M, Lee M-H, and Han B-G (2008). Identification of tumor necrosis factor signaling-related proteins during Epstein-Barr virus-induced B cell transformation. *Acta Virol.* 52(3):151-159.
314. Jeon J-P, Nam H-Y, Shim S-M, and Han B-G (2009). Sustained viral activity of Epstein-Barr virus contributes to cellular immortalization of lymphoblastoid cell lines. *Mol. Cells* 27(2):143-148.
315. Jeurissen ME, Boerbooms AM, and van de Putte LB (1988). Pancytopenia related to azathioprine in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 47(6):503-505.
316. Jharap B, Seinen ML, de Boer NKH, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, Mulder CJJ, and van Bodegraven AA (2010). Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm. Bowel Dis.* 16(9):1541-1549.
317. Jharap B, de Boer NKH, Stokkers P, Hommes DW, Oldenburg B, Dijkstra G, van der Woude CJ, de Jong DJ, Mulder CJJ, van Elburg RM, et al. (2013). Intrauterine exposure and pharmacology of conventional thiopurine therapy in pregnant patients with inflammatory bowel disease. *Gut.*
318. Jiang J, Fridley BL, Feng Q, Abo RP, Brisbin A, Batzler A, Jenkins G, Long PA, and Wang L (2013). Genome-wide association study for biomarker identification of Rapamycin and Everolimus using a lymphoblastoid cell line system. *Front. Genet.* 4:166.

Note : références majeures en gras

319. De Jong DJ, Derijks LJJ, Naber AHJ, Hooymans PM, and Mulder CJJ (2003). Safety of thiopurines in the treatment of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 239(1):69–72.
320. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491(7422):119–124.
321. Kader HA, Raynor SC, Young R, Kaufman SS, Vanderhoof J, Ruby EI, and Mack DR (1997). Introduction of 6-mercaptopurine in Crohn's disease patients during the perioperative period: a preliminary evaluation of recurrence of disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25(1):93–97.
322. Kalow W (1956). Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *The Lancet* 268(6942):576–577.
323. Kamatani N, Yamanaka H, Nishioka K, Nakamura T, Nakano K, Tanimoto K, Mizuno T, and Nishida Y (1984). A new method for the detection of Lesch-Nyhan heterozygotes by peripheral blood T cell culture using T cell growth factor. *Blood* 63(4):912–916.
324. Karas-Kuzelicki N, Milek M, and Mlinaric-Rascan I (2010). MTHFR and TYMS genotypes influence TPMT activity and its differential modulation in males and females. *Clin. Biochem.* 43(1-2):37–42.
- 325. Karner S, Shi S, Fischer C, Schaeffeler E, Neurath MF, Herrlinger KR, Hofmann U, and Schwab M (2010). Determination of 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate and nucleoside diphosphate kinase activity in erythrocytes: novel targets for thiopurine therapy? *Ther. Drug Monit.* 32(2):119–128.**
- 326. Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, Schaeffeler E, Deflandre J, Graepler F, Schmiegelow K, Gregor M, Zanger UM, Eichelbaum M, et al. (2003). Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 52(1):140–142.**
327. Kennedy DT, Hayney MS, and Lake KD (1996). Azathioprine and allopurinol: the price of an avoidable drug interaction. *Ann. Pharmacother.* 30(9):951–954.
328. Kham SKY, Soh CK, Aw DCW, and Yeoh AEJ (2009). TPMT\*26 (208F-->L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68(1):120–123.
329. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Abadir A, Marshall JK, Talley NJ, and Moayyedi P (2011). Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 106(4):661–673.
330. Khan N, Abbas AM, Lichtenstein GR, Loftus EV Jr, and Bazzano LA (2013). Risk of lymphoma in patients with ulcerative colitis treated with thiopurines: a nationwide retrospective cohort study. *Gastroenterology* 145(5):1007–1015.e3.
331. Kho AN, Pacheco JA, Peissig PL, Rasmussen L, Newton KM, Weston N, Crane PK, Pathak J, Chute CG, Bielinski SJ, et al. (2011). Electronic medical records for genetic research: results of the eMERGE consortium. *Sci. Transl. Med.* 3(79):79re1.
332. Kirschner BS (1998). Safety of azathioprine and 6-mercaptopurine in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115(4):813–821.
333. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, et al. (2005). Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308(5720):385–389.
334. Ko RH, Ji L, Barnette P, Bostrom B, Hutchinson R, Raetz E, Seibel NL, Twist CJ, Eckroth E, Sposto R, et al. (2010). Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28(4):648–654.
335. Kobayashi H, Krüger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, et al. (2003). Haploinsufficiency at the alpha-synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 126(Pt 1):32–42.
336. Kohane IS (2011). Using electronic health records to drive discovery in disease genomics. *Nat. Rev. Genet.* 12(6):417–428.
337. Kohane IS, Drazen JM, and Campion EW (2012). A glimpse of the next 100 years in medicine. *N. Engl. J. Med.* 367(26):2538–2539.
338. Kopylov U, and Seidman EG (2014). Role of capsule endoscopy in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 20(5):1155–1164.



339. Kopylov U, Amre D, Theoret Y, Deslandres C, and Seidman EG (2014). Thiopurine Metabolite Ratios for Monitoring Therapy in Pediatric Crohn's Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*
340. Kornberg A, Lieberman I, and Simms ES (1955). Enzymatic synthesis of purine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 215(1):417–427.
341. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, van den Berg A, Suurmeijer AJ, Bischoff R, Gietema JA, and de Jong S (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J. Clin. Invest.* 120(10):3594–3605.
342. Krenitsky TA, Neil SM, Elion GB, and Hitchings GH (1972). A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 150(2):585–599.
343. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, Du W, Boyd K, Cheok M, Nakauchi H, et al. (2008). Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res.* 68(13):4983–4989.
344. Krynetski E, and Evans WE (2003). Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 22(47):7403–7413.
345. Krynetski EY, and Evans WE (2000). Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 61(3):136–146.
- 346. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, and Evans WE (1995). A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(4):949–953.**
347. Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M, and Hiratsuka M (2008). Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet. Genomics* 18(3):243–251.
348. Kurowski V, and Iven H (1991). Plasma concentrations and organ distribution of thiopurines after oral application of azathioprine in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 28(1):7–14.
349. Kurtovic S, Grehn L, Karlsson A, Hellman U, and Mannervik B (2008). Glutathione transferase activity with a novel substrate mimics the activation of the prodrug azathioprine. *Anal. Biochem.* 375(2):339–344.
350. Kurzawski M, Dziwanowski K, Lener A, and Drozdik M (2009). TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 65(5):533–540.
351. Kwan LY, Devlin SM, Mirocha JM, and Papadakis KA (2008). Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 40(6):425–432.

**- L -**

352. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860–921.
353. Landy J, Bhuva N, Marinaki A, and Mawdsley J (2011). Novel thiopurine methyltransferase variant TPMT\*28 results in a misdiagnosis of TPMT deficiency. *Inflamm. Bowel Dis.* 17(6):1441–1442.
354. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, and Dobos GJ (2008). Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am. J. Gastroenterol.* 103(1):162–169.
355. Larsen K (2009). Gertrude Elion. Disponible sur : <http://jwa.org/encyclopedia/article/elion-gertrude-belle> [Accédé le : May 19, 2014].
356. Lawrence JB, Villave CA, and Singer RH (1988). Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52(1):51–61.
357. Lawson DH, Lovatt GE, Gurton CS, and Hennings RC (1984). Adverse effects of azathioprine. *Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev.* 3(3):161–171.
358. Lawson MM, Thomas AG, and Akobeng AK (2006). Tumour necrosis factor alpha blocking agents for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (3):CD005112.
359. Lazarou J, Pomeranz BH, and Corey PN (1998). Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 279(15):1200–1205.
360. Ledder OD, Lemberg DA, Ooi CY, and Day AS (2013). Are thiopurines always contraindicated after thiopurine-induced pancreatitis in inflammatory bowel disease? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 57(5):583–586.
361. Lee CK, Loh TP, Wong ST, Lee HK, Huan PT, Chiu L-L, and Koay ES-C (2012a). Detection of a novel single nucleotide polymorphism of the human thiopurine s-methyltransferase gene in a Chinese individual. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27(5):559–561.
362. Lee J-E, Nam H-Y, Shim S-M, Bae G-R, Han B-G, and Jeon J-P (2010). Expression phenotype changes of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines during long-term subculture and its clinical significance. *Cell Prolif.* 43(4):378–384.
363. Lee J-E, Hong E-J, Nam H-Y, Hwang M, Kim J-H, Han B-G, and Jeon J-P (2012b). Molecular signatures in response to Isoliquiritigenin in lymphoblastoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427(2):392–397.
364. Lee SS, Kim W-Y, Jang Y-J, and Shin J-G (2008). Duplex pyrosequencing of the TPMT\*3C and TPMT\*6 alleles in Korean and Vietnamese populations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 398(1-2):82–85.
365. Lemann M, Mary J-Y, Colombel J-F, Duclos B, Soule J-C, Lerebours E, Modigliani R, and Bouhnik Y (2005). A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 128(7):1812–1818.
366. Lemann M, Mary J-Y, Duclos B, Veyrac M, Dupas J-L, Delchier JC, Laharie D, Moreau J, Cadiot G, Picon L, et al. (2006). Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 130(4):1054–1061.
367. De Lemos ML, Hamata L, Jennings S, and Leduc T (2007). Interaction between mercaptopurine and milk. *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.* 13(4):237–240.
368. Lennard L (1992). The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43(4):329–339.
369. Lennard L (2002). TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 51(2):143–146.
- 370. Lennard L, and Singleton HJ (1992). High-performance liquid chromatographic assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J. Chromatogr.* 583(1):83–90.**
371. Lennard L, Keen D, and Lilleyman JS (1986). Oral 6-mercaptopurine in childhood leukemia: parent drug pharmacokinetics and active metabolite concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 40(3):287–292.

Note : références majeures en gras

372. Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, and Weinshilboum RM (1987). Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 41(1):18–25.
373. Lennard L, Van Loon JA, and Weinshilboum RM (1989). Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 46(2):149–154.
374. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, and Weinshilboum RM (1990). Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336(8709):225–229.
375. Lennard L, Hale JP, and Lilleyman JS (1993). Red blood cell hypoxanthine phosphoribosyltransferase activity measured using 6-mercaptopurine as a substrate: a population study in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 36(4):277–284.
376. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, and Vora A (2013). Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76(1):125–136.
377. Leong RW, Gearry RB, and Sparrow MP (2008). Thiopurine hepatotoxicity in inflammatory bowel disease: the role for adding allopurinol. *Expert Opin. Drug Saf.* 7(5):607–616.
378. Lesch M, and Nyhan WL (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36:561–570.
379. Lesko LJ (2008). The critical path of warfarin dosing: finding an optimal dosing strategy using pharmacogenetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(3):301–303.
380. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, et al. (2011). Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm. Bowel Dis.* 17(6):1314–1321.
381. Lewis JD (2011). The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140(6):1817–1826.e2.
382. Li L, Fridley B, Kalari K, Jenkins G, Batzler A, Safgren S, Hildebrandt M, Ames M, Schaid D, and Wang L (2008). Gemcitabine and cytosine arabinoside cytotoxicity: association with lymphoblastoid cell expression. *Cancer Res.* 68(17):7050–7058.
383. Li L, Fridley BL, Kalari K, Jenkins G, Batzler A, Weinshilboum RM, and Wang L (2009). Gemcitabine and arabinosylcytosin pharmacogenomics: genome-wide association and drug response biomarkers. *PLoS One* 4(11):e7765.
384. Li L, Fridley BL, Kalari K, Niu N, Jenkins G, Batzler A, Abo RP, Schaid D, and Wang L (2014). Discovery of genetic biomarkers contributing to variation in drug response of cytidine analogues using human lymphoblastoid cell lines. *BMC Genomics* 15:93.
385. Liao KP, Kurreeman F, Li G, Duclos G, Murphy S, P RG, Cai T, Gupta N, Gainer V, Schur P, et al. (2012). Autoantibodies, autoimmune risk alleles and clinical associations in rheumatoid arthritis cases and non-RA controls in the electronic medical records. *Arthritis Rheum.*
386. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W, and American Gastroenterological Association (2006). American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130(3):940–987.
387. Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, Wu C, Liu W, Yuan Y, Tang R, et al. (2001). Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J. Biol. Chem.* 276(22):18695–18701.
388. Lindqvist M, Haglund S, Almer S, Peterson C, Taipalensu J, Hertervig E, Lyrenäs E, and Söderkvist P (2004). Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* 14(4):261–265.
389. Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A, Söderkvist P, Peterson C, Kidhall I, and Almer S (2007). Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT\*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT\*23. *Pharmacogenet. Genomics* 17(10):891–895.
390. Liu M-T, Chen Y-R, Chen S-C, Hu C-Y, Lin C-S, Chang Y-T, Wang W-B, and Chen J-Y (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene* 23(14):2531–2539.



- 391. Liu X, Yue P, Khuri FR, and Sun S-Y (2005). Decoy receptor 2 (DcR2) is a p53 target gene and regulates chemosensitivity. *Cancer Res.* 65(20):9169–9175.
- 392. Livak KJ, and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25(4):402–408.
- 393. Loennechen T, Utsi E, Hartz I, Lysaa R, Kildalsen H, and Aarbakke J (2001). Detection of one single mutation predicts thiopurine S-methyltransferase activity in a population of Saami in northern Norway. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70(2):183–188.
- 394. Van Loon JA, and Weinshilboum RM (1982). Thiopurine methyltransferase biochemical genetics: human lymphocyte activity. *Biochem. Genet.* 20(7-8):637–658.
- 395. Van Loon JA, Szumlanski CL, and Weinshilboum RM (1992). Human kidney thiopurine methyltransferase. Photoaffinity labeling with S-adenosyl-L-methionine. *Biochem. Pharmacol.* 44(4):775–785.
- 396. Lowe HJ, Ferris TA, Hernandez PM, and Weber SC (2009). STRIDE--An integrated standards-based translational research informatics platform. *AMIA Annu. Symp. Proc. AMIA Symp. AMIA Symp.* 2009:391–395.
- 397. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, and Sandborn WJ (2001). Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 49(5):665–670.
- 398. Lunardi A, Di Minin G, Provero P, Dal Ferro M, Carotti M, Del Sal G, and Collavin L (2010). A genome-scale protein interaction profile of Drosophila p53 uncovers additional nodes of the human p53 network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(14):6322–6327.

## - M - N -

399. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, and Smith RL (1977). Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2(8038):584–586.
400. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina J-M, Workman C, Tomazic J, Jägel-Guedes E, Rugina S, Kozyrev O, Cid JF, et al. (2008). HLA-B\*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N. Engl. J. Med.* 358(6):568–579.
401. Marchesi SL, and Sartorelli AC (1963). The biochemical basis for the differential sensitivity of intestinal mucosa and bone marrow to 6-thioguanine. *Cancer Res.* 23:1769–1773.
402. **Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre E-M, Escuredo E, Fairbanks LD, and Sanderson JD (2004). Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 14(3):181–187.**
403. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Lesser M, and Daum F (2000). A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* 119(4):895–902.
404. Marra CA, Esdaile JM, and Anis AH (2002). Practical pharmacogenetics: the cost effectiveness of screening for thiopurine s-methyltransferase polymorphisms in patients with rheumatological conditions treated with azathioprine. *J. Rheumatol.* 29(12):2507–2512.
405. Marsh S, King CR, Ahluwalia R, and McLeod HL (2004). Distribution of ITPA P32T alleles in multiple world populations. *J. Hum. Genet.* 49(10):579–581.
406. Maser EA, Villela R, Silverberg MS, and Greenberg GR (2006). Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4(10):1248–1254.
407. **Matimba A, Li F, Livshits A, Cartwright CS, Scully S, Fridley BL, Jenkins G, Batzler A, Wang L, Weinshilboum R, et al. (2014). Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes. *Pharmacogenomics* 15(4):433–447.**
408. McCarty CA, Chisholm RL, Chute CG, Kullo IJ, Jarvik GP, Larson EB, Li R, Masys DR, Ritchie MD, Roden DM, et al. (2011). The eMERGE Network: a consortium of biorepositories linked to electronic medical records data for conducting genomic studies. *BMC Med. Genomics* 4:13.
409. McDonald GT, Sullivan R, Paré GC, and Graham CH (2010). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase promotes tumor cell resistance to chemotherapeutic agents via a mechanism involving delay in cell cycle progression. *Exp. Cell Res.* 316(19):3197–3206.
410. McDonald JWD, Tsoulis DJ, Macdonald JK, and Feagan BG (2012). Methotrexate for induction of remission in refractory Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12:CD003459.
411. McGovern DPB, Travis SPL, Duley J, Shobowale-Bakre EM, and Dalton HR (2002). Azathioprine intolerance in patients with IBD may be imidazole-related and is independent of TPMT activity. *Gastroenterology* 122(3):838–839.
412. McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, and Evans WE (1995a). Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 5(5):281–286.
413. **McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH, and Evans WE (1995b). Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85(7):1897–1902.**
414. **McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, and Evans WE (2000). Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14(4):567–572.**
415. Medina MW, Theusch E, Naidoo D, Bauzon F, Stevens K, Mangravite LM, Kuang Y-L, and Krauss RM (2012). RHOA is a modulator of the cholesterol-lowering effects of statin. *PLoS Genet.* 8(11):e1003058.
416. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, et al. (2009). Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* 360(4):354–362.

Note : références majeures en gras

417. Meggitt SJ, Gray JC, and Reynolds NJ (2006). Azathioprine dosed by thiopurine methyltransferase activity for moderate-to-severe atopic eczema: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367(9513):839–846.
418. Mei Y-P, Zhu X-F, Zhou J-M, Huang H, Deng R, and Zeng Y-X (2006). siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett.* 232(2):189–198.
419. Mendoza JL, and Abreu MT (2009). Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 33 Suppl 3:S158–173.
420. Middeldorp JM, Brink AATP, van den Brule AJC, and Meijer CJLM (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45(1):1–36.
421. Miheller P, and Lakatos PL (2010). Thiopurines in Crohn's disease, is there something new? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6(12):1505–1514.
422. Milek M, Karas Kuzelicki N, Smid A, and Mlinaric-Rascan I (2009). S-adenosylmethionine regulates thiopurine methyltransferase activity and decreases 6-mercaptopurine cytotoxicity in MOLT lymphoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 77(12):1845–1853.
- 423. Milek M, Smid A, Tamm R, Kuzelicki NK, Metspalu A, and Mlinaric-Rascan I (2012). Post-translational stabilization of thiopurine S-methyltransferase by S-adenosyl-L-methionine reveals regulation of TPMT\*1 and \*3C allozymes. *Biochem. Pharmacol.* 83(7):969–976.**
424. Mircheva J, Legendre C, Soria-Royer C, Thervet E, Beaune P, and Kreis H (1995). Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 60(7):639–642.
425. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, et al. (2012). Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 142(1):46–54.e42.
- 426. Morag A, Kirchheiner J, Rehavi M, and Gurwitz D (2010). Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways. *Pharmacogenomics* 11(3):327–340.**
427. Morag A, Pasmanik-Chor M, Oron-Karni V, Rehavi M, Stingl JC, and Gurwitz D (2011). Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker. *Pharmacogenomics* 12(2):171–184.
- 428. Moreau AC, Paul S, Del Tedesco E, Rinaudo-Gaujous M, Boukhadra N, Genin C, Peyrin-Biroulet L, and Roblin X (2014). Association between 6-thioguanine nucleotides levels and clinical remission in inflammatory disease: a meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 20(3):464–471.**
429. Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, and Cheung VG (2004). Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* 430(7001):743–747.
430. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, and MacDonald TT (1993). Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 34(12):1705–1709.
431. Murphy SN, Weber G, Mendis M, Gainer V, Chueh HC, Churchill S, and Kohane I (2010). Serving the enterprise and beyond with informatics for integrating biology and the bedside (i2b2). *J Am Med Inf. Assoc* 17:124–130.
432. Naber AH, Van Haelst U, and Yap SH (1991). Nodular regenerative hyperplasia of the liver: an important cause of portal hypertension in non-cirrhotic patients. *J. Hepatol.* 12(1):94–99.
- 433. Nam H-Y, Shim S-M, Han B-G, and Jeon J-P (2011). Human lymphoblastoid cell lines: a goldmine for the biobankomics era. *Pharmacogenomics* 12(6):907–917.**
434. National Research Council (US) Committee on A Framework for Developing a New Taxonomy of Disease (2011). Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease. Disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91503/> [Accédé le : March 21, 2014].
- 435. Neurath MF, Kiesslich R, Teichgräber U, Fischer C, Hofmann U, Eichelbaum M, Galle PR, and Schwab M (2005). 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 3(10):1007–1014.**

436. Newman WG, Payne K, Tricker K, Roberts SA, Fargher E, Pushpakom S, Alder JE, Sidgwick GP, Payne D, Elliott RA, et al. (2011). A pragmatic randomized controlled trial of thiopurine methyltransferase genotyping prior to azathioprine treatment: the TARGET study. *Pharmacogenomics* 12(6):815–826.
437. Nguyen T-M-H, Daubard M, Le Gall C, Larger M, Lachaux A, and Boulieu R (2010). Monitoring of azathioprine metabolites in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Ther. Drug Monit.* 32(4):433–437.
438. **Nguyen T-V-A, Vu DH, Nguyen T-M-H, Lachaux A, and Boulieu R (2013a). Relationship between azathioprine dosage and thiopurine metabolites in pediatric IBD patients: identification of covariables using multilevel analysis. *Ther. Drug Monit.* 35(2):251–257.**
439. **Nguyen T-V-A, Vu DH, Nguyen T-M-H, Lachaux A, and Boulieu R (2013b). Exploring associations of 6-thioguanine nucleotide levels and other predictive factors with therapeutic response to azathioprine in pediatric patients with IBD using multilevel analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 19(11):2404–2410.**
440. Nguyen T-V-A, Nguyen T-M-H, Lachaux A, and Boulieu R (2013c). Usefulness of thiopurine metabolites in predicting azathioprine resistance in pediatric IBD patients. *J. Clin. Pharmacol.* 53(9):900–908.
441. Niu N, Qin Y, Fridley BL, Hou J, Kalari KR, Zhu M, Wu T-Y, Jenkins GD, Batzler A, and Wang L (2010). Radiation pharmacogenomics: a genome-wide association approach to identify radiation response biomarkers using human lymphoblastoid cell lines. *Genome Res.* 20(11):1482–1492.
442. Nobelprize.org (2013). Gertrude B. Elion - Biographical. Disponible sur : [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1988/elion-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/elion-bio.html) [Accédé le :May 18, 2014].
443. Nygaard U, Toft N, and Schmiegelow K (2004). Methylated metabolites of 6-mercaptopurine are associated with hepatotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* 75(4):274–281.

**- O - P - Q -**

444. O'Brien JJ, Bayless TM, and Bayless JA (1991). Use of azathioprine or 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 101(1):39-46.
445. O'Donoghue DP, Dawson AM, Powell-Tuck J, Bown RL, and Lennard-Jones JE (1978). Double-blind withdrawal trial of azathioprine as maintenance treatment for Crohn's disease. *Lancet* 2(8097):955-957.
446. Oh JH, Kim YJ, Moon S, Nam H-Y, Jeon J-P, Lee JH, Lee J-Y, and Cho YS (2013). Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines. *J. Hum. Genet.* 58(1):16-20.
447. Oh K-T, Anis AH, and Bae S-C (2004). Pharmacoeconomic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism screening by polymerase chain reaction for treatment with azathioprine in Korea. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 43(2):156-163.
448. Ohtsuka Y, Arai K, Aoyagi Y, Fujii T, Yamakawa Y, Ohtani K, Ikuse T, Baba Y, Inage E, Kudo T, et al. (2010). Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25(10):1626-1630.
449. Oliveira E, Quental S, Alves S, Amorim A, and Prata MJ (2007). Do the distribution patterns of polymorphisms at the thiopurine S-methyltransferase locus in sub-Saharan populations need revision? Hints from Cabinda and Mozambique. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 63(7):703-706.
450. Olson JE, Bielinski SJ, Ryu E, Winkler EM, Takahashi PY, Pathak J, and Cerhan JR (2014). Biobanks and personalized medicine. *Clin. Genet.* 86(1):50-55.
451. OMS WHO | International Classification of Diseases (ICD). Disponible sur : <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2008/fr#/> [Accédé le :March 30, 2014].
452. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, and Sandborn WJ (2012). Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91(4):635-646.
453. Oselin K, and Anier K (2007). Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35(9):1452-1454.
454. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, and Lewis JD (2006). Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology* 130(4):1047-1053.
455. Osterman MT, Sandborn WJ, Colombel J-F, Robinson AM, Lau W, Huang B, Pollack PF, Thakkar RB, and Lewis JD (2014). Increased risk of malignancy with adalimumab combination therapy, compared with monotherapy, for Crohn's disease. *Gastroenterology* 146(4):941-949.
456. Otterness D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, et al. (1997). Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 62(1):60-73.
457. Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, and Weinshilboum RM (1998). Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J. Clin. Invest.* 101(5):1036-1044.
458. Overall RW, Kempermann G, Peirce J, Lu L, Goldowitz D, Gage FH, Goodwin S, Smit AB, Airey DC, Rosen GD, et al. (2009). Genetics of the hippocampal transcriptome in mouse: a systematic survey and online neurogenomics resource. *Front. Neurosci.* 3:55.
459. Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Vecchi M, D'Inca R, Guagnozzi D, Tonelli F, Cucchiara S, Valvano MR, Latiano T, et al. (2007). Sequential evaluation of thiopurine methyltransferase, inosine triphosphate pyrophosphatase, and HPRT1 genes polymorphisms to explain thiopurines' toxicity and efficacy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26(5):737-745.
460. Parks DA, and Granger DN (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548:87-99.
461. Pathak J, Kiefer RC, Bielinski SJ, and Chute CG (2012). Applying semantic web technologies for phenome-wide scan using an electronic health record linked Biobank. *J. Biomed. Semant.* 3(1):10.
- 462. Pathak J, Kho AN, and Denny JC (2013). Electronic health records-driven phenotyping: challenges, recent advances, and perspectives. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 20(e2):e206-211.**

Note : références majeures en gras



463. Pearson DC, May GR, Fick GH, and Sutherland LR (1995). Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 123(2):132–142.
464. Pearson DC, May GR, Fick G, and Sutherland LR (2000). Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2):CD000067.
465. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, and Rutgeerts P (2001). Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 96(3):730–734.
466. Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek SM, Torstenson ES, Ambite JL, Avery CL, Buyske S, Cai C, Fesinmeyer MD, Haiman C, et al. (2011). The use of phenome-wide association studies (PheWAS) for exploration of novel genotype-phenotype relationships and pleiotropy discovery. *Genet Epidemiol* 35:410–422.
467. Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek S, Frase A, Torstenson ES, Goodloe R, Ambite JL, Avery CL, Buyske S, Bůžková P, et al. (2013). Phenome-Wide Association Study (PheWAS) for Detection of Pleiotropy within the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Network. *PLoS Genet* 9(1):e1003087.
468. Peng X-X, Shi Z, Damaraju VL, Huang X-C, Kruh GD, Wu H-C, Zhou Y, Tiwari A, Fu L, Cass CE, et al. (2008). Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leuk. Res.* 32(5):799–809.
469. Peyrin-Biroulet L, Standaert-Vitse A, Branche J, and Chamaillard M (2007). IBD serological panels: facts and perspectives. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(12):1561–1566.
470. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, de Suray N, Branche J, Sandborn WJ, and Colombel J-F (2008). Efficacy and safety of tumor necrosis factor antagonists in Crohn's disease: meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 6(6):644–653.
471. Peyrin-Biroulet L, Deltenre P, Ardizzone S, D'Haens G, Hanauer SB, Herfarth H, Lémann M, and Colombel J-F (2009). Azathioprine and 6-mercaptopurine for the prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 104(8):2089–2096.
472. Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Peters GJ, Hählen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, and Veerman AJ (1992). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase in childhood leukemia: relation with immunophenotype, in vitro drug resistance and clinical prognosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 51(2):213–217.
473. Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, and Colombel J-F (2010). Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7(1):15–29.
- 474. Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S, Strand D, Tanaka S, Galle PR, Bustelo XR, et al. (2006). Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176(1):640–651.**
475. Pouyanne P, Haramburu F, Imbs JL, and Bégaud B (2000). Admissions to hospital caused by adverse drug reactions: cross sectional incidence study. French Pharmacovigilance Centres. *BMJ* 320(7241):1036.
476. Pozler O, Chládek J, Malý J, Hroch M, Dědek P, Beránek M, and Krásničanová P (2010). Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* 4(6):623–628.
477. Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, and Cepoiu M (2009). Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* (1):CD000067.
478. Prefontaine E, Macdonald JK, and Sutherland LR (2010). Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (6):CD000545.
479. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, and Korelitz BI (1989). 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann. Intern. Med.* 111(8):641–649.
480. Pui C-H, and Evans WE (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 354(2):166–178.
481. Pulley J, Clayton E, Bernard GR, Roden DM, and Masys DR (2010). Principles of human subjects protections applied in an opt-out, de-identified biobank. *Clin. Transl. Sci.* 3(1):42–48.

482. Qasim A, Buckley M, and O' Morain CA (2002). Thiopurine metabolites and the role of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease. *Gut* 51(1):141; author reply 141–142.

**- R -**

483. Rahhal RM, and Bishop WP (2008). Initial clinical experience with allopurinol-thiopurine combination therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14(12):1678–1682.
484. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griesse M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, et al. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* 365(18):1663–1672.
485. Reed M, Huang J, Brand R, Graetz I, Neugebauer R, Fireman B, Jaffe M, Ballard DW, and Hsu J (2013). Implementation of an outpatient electronic health record and emergency department visits, hospitalizations, and office visits among patients with diabetes. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 310(10):1060–1065.
486. Reiner A, Yekutieli D, and Benjamini Y (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 19(3):368–375.
487. Reinisch W, Angelberger S, Petritsch W, Shonova O, Lukas M, Bar-Meir S, Teml A, Schaeffeler E, Schwab M, Dilger K, et al. (2010). Azathioprine versus mesalazine for prevention of postoperative clinical recurrence in patients with Crohn's disease with endoscopic recurrence: efficacy and safety results of a randomised, double-blind, double-dummy, multicentre trial. *Gut* 59(6):752–759.
- 488. Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW, Behrens C, von Tirpitz C, Stallmach A, Herfarth H, Stein J, Bias P, Adler G, et al. (2007). 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin. Chem.* 53(7):1306–1314.**
489. Relling MV, and Dervieux T (2001). Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 1(2):99–108.
490. Relling MV, Lin JS, Ayers GD, and Evans WE (1992). Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52(6):643–658.
- 491. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, and Evans WE (1999). Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J. Natl. Cancer Inst.* 91(23):2001–2008.**
- 492. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, and Klein TE (2011a). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(3):387–391.**
493. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, Stein CM, Carrillo M, Evans WE, Hicks JK, et al. (2013). Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* 93(4):324–325.
494. Remy CN (1963). Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 238:1078–1084.
495. Reumaux D, Sendid B, Poulain D, Duthilleul P, Dewit O, and Colombel J-F (2003). Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(1):19–35.
496. Reuther LO, Sonne J, Larsen NE, Larsen B, Christensen S, Rasmussen SN, Tofteng F, Haaber A, Johansen N, Kjeldsen J, et al. (2003a). Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scand. J. Gastroenterol.* 38(9):972–977.
497. Reuther LO, Sonne J, Larsen N, Dahlerup JF, Thomsen OO, and Schmiegelow K (2003b). Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17(1):65–68.
498. Van Rheen PF, Van de Vijver E, and Fidler V (2010). Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* 341:c3369.
499. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, and Rettie AE (2005). Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N. Engl. J. Med.* 352(22):2285–2293.
- 500. Riello L, Talbotec C, Garnier-Lengliné H, Pigneur B, Svahn J, Canioni D, Goulet O, Schmitz J, and Ruemmele FM (2011). Tolerance and efficacy of azathioprine in pediatric Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17(10):2138–2143.**

Note : références majeures en gras



501. Al Rifai A, Prasad N, Shuttleworth E, McBurney H, Pushpakom S, Robinson A, Newman W, and Campbell S (2011). Natural history of azathioprine-associated lymphopenia in inflammatory bowel disease patients: a prospective observational study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23(2):153–158.
502. Ritchie MD (2012). The success of pharmacogenomics in moving genetic association studies from bench to bedside: study design and implementation of precision medicine in the post-GWAS era. *Hum. Genet.* 131(10):1615–1626.
503. Ritchie MD, Denny JC, Zuvich RL, Crawford DC, Schildcrout JS, Bastarache L, Ramirez AH, Mosely JD, Pulley JM, Basford MA, et al. (2013a). Genome- and Phenome-Wide Analysis of Cardiac Conduction Identifies Markers of Arrhythmia Risk. Disponible sur : <http://circ.ahajournals.org/content/early/2013/03/05/CIRCULATIONAHA.112.000604> [Accédé le : March 20, 2013].
504. Ritchie MD, Denny JC, Zuvich RL, Crawford DC, Schildcrout JS, Bastarache L, Ramirez AH, Mosley JD, Pulley JM, Basford MA, et al. (2013b). Genome- and phenome-wide analyses of cardiac conduction identifies markers of arrhythmia risk. *Circulation* 127(13):1377–1385.
505. Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, and Kennedy MA (2007). IMPDH1 promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J.* 7(5):312–317.
506. Roberts RL, Gearry RB, Bland MV, Sies CW, George PM, Burt M, Marinaki AM, Arenas M, Barclay ML, and Kennedy MA (2008). Trinucleotide repeat variants in the promoter of the thiopurine S-methyltransferase gene of patients exhibiting ultra-high enzyme activity. *Pharmacogenet. Genomics* 18(5):434–438.
507. Roberts RL, Wallace MC, Drake JM, and Stamp LK (2014a). Identification of a novel thiopurine S-methyltransferase allele (TPMT\*37). *Pharmacogenet. Genomics* 24(6):320–323.
508. Roberts RL, Wallace MC, Seinen ML, Krishnaprasad K, Chew A, Lawrance I, Prosser R, Bampton P, Grafton R, Simms L, et al. (2014b). PACSIN2 does not influence thiopurine-related toxicity in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 109(6):925–927.
- 509. Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip J-M, Bessard G, and Bonaz B (2003). Drug interaction between infliximab and azathioprine in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18(9):917–925.**
510. Roblin X, Peyrin-Biroulet L, Phelip JM, Nancey S, and Flourie B (2008). A 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10<sup>8</sup> erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *Am. J. Gastroenterol.* 103(12):3115–3122.
- 511. Roblin X, Oussalah A, Chevaux J-B, Sparrow M, and Peyrin-Biroulet L (2011). Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts. *Inflamm. Bowel Dis.* 17(12):2480–2487.**
512. Roden DM, and George AL (2002). The genetic basis of variability in drug responses. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1(1):37–44.
513. Roden DM, Pulley JM, Basford MA, Bernard GR, Clayton EW, Balser JR, and Masys DR (2008). Development of a large-scale de-identified DNA biobank to enable personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(3):362–369.
514. Rogler G, Vavricka S, Schoepfer A, and Lakatos PL (2013). Mucosal healing and deep remission: what does it mean? *World J. Gastroenterol. WJG* 19(43):7552–7560.
515. Von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, Paraskeva P, and Tekkis PP (2007). Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am. J. Gastroenterol.* 102(4):803–813.
516. Roque FS, Jensen PB, Schmock H, Dalgaard M, Andreatta M, Hansen T, Søbey K, Bredkjær S, Juul A, Werge T, et al. (2011). Using Electronic Patient Records to Discover Disease Correlations and Stratify Patient Cohorts. *PLoS Comput Biol* 7(8):e1002141.
517. Rosman M, Lee MH, Creasey WA, and Sartorelli AC (1974). Mechanisms of resistance to 6-thiopurines in human leukemia. *Cancer Res.* 34(8):1952–1956.
518. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braun J, and Seidman EG (1998). Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115(4):822–829.
519. Ruemmele FM, Veres G, Kolho KL, Griffiths A, Levine A, Escher JC, Amil Dias J, Barabino A, Braegger CP, Bronsky J, et al. (2014). Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J. Crohns Colitis.*

Note : références majeures en gras

520. Russmann S, Zimmermann A, Krähenbühl S, Kern B, and Reichen J (2001). Veno-occlusive disease, nodular regenerative hyperplasia and hepatocellular carcinoma after azathioprine treatment in a patient with ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(3):287–290.
521. Rutgeerts P, Löfberg R, Malchow H, Lamers C, Olaison G, Jewell D, Danielsson A, Goebell H, Thomsen OO, and Lorenz-Meyer H (1994). A comparison of budesonide with prednisolone for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 331(13):842–845.
522. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, Williams C, Price A, Talbot I, and Forbes A (2004). Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126(2):451–459.

**- S -**

523. Sahasranaman S, Howard D, and Roy S (2008). Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64(8):753–767.
524. Salavaggione OE, Wang L, Wiepert M, Yee VC, and Weinshilboum RM (2005). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet. Genomics* 15(11):801–815.
525. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, and Schuetz JD (2002). Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 4(3):E14.
526. Sandborn WJ (2001). Rational dosing of azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 48(5):591–592.
- 527. Sandborn WJ, Loftus EV, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, et al. (2001). Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 7(3):192–201.**
528. Sandborn WJ, Feagan BG, and Lichtenstein GR (2007a). Medical management of mild to moderate Crohn's disease: evidence-based treatment algorithms for induction and maintenance of remission. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26(7):987–1003.
529. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, Panaccione R, Wolf D, Kent JD, Bittle B, et al. (2007b). Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* 56(9):1232–1239.
530. Sanderson J, Ansari A, Marinaki T, and Duley J (2004). Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann. Clin. Biochem.* 41(Pt 4):294–302.
531. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, et al. (2004). Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 350(9):876–885.
532. Sasaki T, Goto E, Konno Y, Hiratsuka M, and Mizugaki M (2006). Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine S-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21(4):332–336.
533. Saverymuttu SH, Hodgson HJ, Chadwick VS, and Pepys MB (1986). Differing acute phase responses in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 27(7):809–813.
534. Sawada K, Noda K, Nakajima H, Shimbara N, Furuichi Y, and Sugimoto M (2005). Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-immortal lymphoblastoid cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 28(7):1202–1207.
535. Schaeffeler E, Stanulla M, Greil J, Schrappe M, Eichelbaum M, Zanger UM, and Schwab M (2003). A novel TPMT missense mutation associated with TPMT deficiency in a 5-year-old boy with ALL. *Leukemia* 17(7):1422–1424.
- 536. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, and Schwab M (2004). Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 14(7):407–417.**
537. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Reinisch W, Zanger UM, and Schwab M (2006). Three novel thiopurine S-methyltransferase allelic variants (TPMT\*20, \*21, \*22) - association with decreased enzyme function. *Hum. Mutat.* 27(9):976.
538. Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin J-G, and Schwab M (2008). Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALD-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin. Chem.* 54(10):1637–1647.
539. Scheuner MT, de Vries H, Kim B, Meili RC, Olmstead SH, and Teleki S (2009). Are electronic health records ready for genomic medicine? *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 11(7):510–517.
540. Schmiegelow K, Glomstein A, Kristinsson J, Salmi T, Schröder H, and Björk O (1997). Impact of morning versus evening schedule for oral methotrexate and 6-mercaptopurine on relapse risk for children with acute lymphoblastic leukemia. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 19(2):102–109.

Note : références majeures en gras

541. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijs I, Van Assche G, Hoffman I, Van Steen K, Vermeire S, and Rutgeerts P (2009). Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut* 58(4):492–500.
542. Schoepfer AM, Trummel M, Seeholzer P, Seibold-Schmid B, and Seibold F (2008). Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies. *Inflamm. Bowel Dis.* 14(1):32–39.
543. Schroeder KW, Tremaine WJ, and Ilstrup DM (1987). Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N. Engl. J. Med.* 317(26):1625–1629.
544. Schütz E, Gummert J, Mohr F, and Oellerich M (1993). Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet* 341(8842):436.
545. Schütz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, and Oellerich M (1996). Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* 34(3):199–205.
546. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Zanger U, Aulitzky W, and Eichelbaum M (2001). Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology* 121(2):498–499.
- 547. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fischer C, Lang T, Behrens C, Gregor M, Eichelbaum M, Zanger UM, and Kaskas BA (2002). Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* 12(6):429–436.**
548. Schwahn B, and Rozen R (2001). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am. J. Pharmacogenomics Genomics-Relat. Res. Drug Dev. Clin. Pract.* 1(3):189–201.
549. Schwarz G (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62(23):2792–2810.
550. Seiderer J, Zech CJ, Reinisch W, Lukas M, Diebold J, Wrba F, Teml A, Chalupna P, Stritesky J, Schoenberg SO, et al. (2005). A multicenter assessment of liver toxicity by MRI and biopsy in IBD patients on 6-thioguanine. *J. Hepatol.* 43(2):303–309.
551. Seiderer J, Zech CJ, Diebold J, Schoenberg SO, Brand S, Tillack C, Göke B, and Ochsenkühn T (2006). Nodular regenerative hyperplasia: a reversible entity associated with azathioprine therapy. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 18(5):553–555.
552. Seidman EG (2003). Clinical use and practical application of TPMT enzyme and 6-mercaptopurine metabolite monitoring in IBD. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 3 Suppl 1:S30–38.
553. Seinen ML, de Boer NKH, Smid K, van Asseldonk DP, Bouma G, van Bodegraven AA, and Peters GJ (2011). Allopurinol enhances the activity of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in inflammatory bowel disease patients during low-dose thiopurine therapy: preliminary data of an ongoing series. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 30(12):1085–1090.
- 554. Seinen ML, van Asseldonk DP, de Boer NKH, Losekoot N, Smid K, Mulder CJJ, Bouma G, Peters GJ, and van Bodegraven AA (2013a). The effect of allopurinol and low-dose thiopurine combination therapy on the activity of three pivotal thiopurine metabolizing enzymes: results from a prospective pharmacological study. *J. Crohns Colitis* 7(10):812–819.**
555. Seinen ML, van Bodegraven AA, van Kuilenburg ABP, and de Boer NKH (2013b). High TPMT activity as a risk factor for severe myelosuppression during thiopurine therapy. *Neth. J. Med.* 71(4):222.
556. Seksik P, Mary J-Y, Beaugier L, Lémann M, Colombel J-F, Vernier-Massouille G, and Cosnes J (2011). Incidence of nodular regenerative hyperplasia in inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine. *Inflamm. Bowel Dis.* 17(2):565–572.
557. Seow CH, Benchimol EI, Griffiths AM, Otley AR, and Steinhart AH (2008). Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (3):CD000296.
558. Seow CH, Newman A, Irwin SP, Steinhart AH, Silverberg MS, and Greenberg GR (2010). Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut* 59(1):49–54.
559. Serghini M, Haddad W, Jeddi H, Karoui S, Ben Mustapha N, Kallel L, Fekih M, Matri S, Boubaker J, and Filali A (2012). [Efficacy and safety of Adalimumab in Crohn's disease]. *Tunis. Médicale* 90(2):101–107.

Note : références majeures en gras

560. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E, D'Antico S, Giaccone M, Avagnina A, Baldi M, Barbera C, Curti F, Pera A, et al. (2009). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics* 10(11):1753–1765.
561. Serre-Debeauvais F, Bayle F, Amirou M, Bechtel Y, Boujet C, Vialtel P, and Bessard G (1995). [Hematotoxicity caused by azathioprine genetically determined and aggravated by xanthine oxidase deficiency in a patient following renal transplantation]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 24(21):987–988.
562. Shah NH, and Tenenbaum JD (2012). The coming age of data-driven medicine: translational bioinformatics' next frontier. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 19(1e):e2–4.
563. Shameer K, Denny JC, Ding K, Jouni H, Crosslin DR, de Andrade M, Chute CG, Peissig P, Pacheco JA, Li R, et al. (2014). A genome- and phenome-wide association study to identify genetic variants influencing platelet count and volume and their pleiotropic effects. *Hum. Genet.* 133(1):95–109.
564. Sherlock ME, Seow CH, Steinhart AH, and Griffiths AM (2010). Oral budesonide for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (10):CD007698.
565. Shibolet O, Regushevskaya E, Brezis M, and Soares-Weiser K (2005). Cyclosporine A for induction of remission in severe ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1):CD004277.
566. Shih DQ, Nguyen M, Ibanez P, Kwan LY, Targan SR, and Vasiliasauskas EA (2009). W1206 Split-Dose Administration of 6-Mercaptopurine/Azathioprine: A Effective Novel Strategy for IBD Patients with Preferential 6mmp Metabolism. *Gastroenterology* 136(5, Supplement 1):A-677–A-678.
567. Shih DQ, Nguyen M, Zheng L, Ibanez P, Mei L, Kwan LY, Bradford K, Ting C, Targan SR, and Vasiliasauskas EA (2012). Split-dose administration of thiopurine drugs: a novel and effective strategy for managing preferential 6-MMP metabolism. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36(5):449–458.
568. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, and Oellerich M (2003). Differences in nucleotide hydrolysis contribute to the differences between erythrocyte 6-thioguanine nucleotide concentrations determined by two widely used methods. *Clin. Chem.* 49(2):260–268.
569. Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, and von Ahsen N (2006). Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin. Chem.* 52(2):240–247.
570. Shivade C, Raghavan P, Fosler-Lussier E, Embi PJ, Elhadad N, Johnson SB, and Lai AM (2014). A review of approaches to identifying patient phenotype cohorts using electronic health records. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 21(2):221–230.
571. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, et al. (2009). Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 302(8):849–857.
572. Sie L, Loong S, and Tan EK (2009). Utility of lymphoblastoid cell lines. *J. Neurosci. Res.* 87(9):1953–1959.
573. Sies C, Florkowski C, George P, Gearry R, Barclay M, Harraway J, Pike L, and Walmsley T (2005). Measurement of thiopurine methyl transferase activity guides dose-initiation and prevents toxicity from azathioprine. *N. Z. Med. J.* 118(1210):U1324.
574. Simone PD, Struble LR, Kellezi A, Brown CA, Grabow CE, Khutsishvili I, Marky LA, Pavlov YI, and Borgstahl GEO (2013). The human ITPA polymorphic variant P32T is destabilized by the unpacking of the hydrophobic core. *J. Struct. Biol.* 182(3):197–208.
575. Sipponen T, Savilahti E, Kolho K-L, Nuutinen H, Turunen U, and Färkkilä M (2008). Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm. Bowel Dis.* 14(1):40–46.
576. Skrzypczak-Zielinska M, Borun P, Milanowska K, Jakubowska-Burek L, Zakerska O, Dobrowolska-Zachwieja A, Plawski A, Froster UG, Szalata M, and Slomski R (2013). High-resolution melting analysis of the TPMT gene: a study in the Polish population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 17(2):153–159.
577. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M, Shobowale-Bakre M, Lewis CM, Ansari A, Duley J, and Sanderson JD (2009). Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 30(4):375–384.
578. Smith MA, Blaker P, Marinaki AM, Anderson SH, Irving PM, and Sanderson JD (2012). Optimising outcome on thiopurines in inflammatory bowel disease by co-prescription of allopurinol. *J. Crohns Colitis* 6(9):905–912.

Note : références majeures en gras



579. Solem CA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, and Sandborn WJ (2005). Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 11(8):707–712.
580. Spannbrucker N, Eichelbaum M, Steinke B, and Dengler HJ (1978). [A human genetic defect in the metabolism of sparteine]. *Verhandlungen Dtsch. Ges. Für Inn. Med.* (84):1125–1127.
581. Sparrow MP (2010). IBD: Switching metabolism-can two drugs be better than one? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7(8):420–422.
- 582. Sparrow MP, Hande SA, Friedman S, Lim WC, Reddy SI, Cao D, and Hanauer SB (2005). Allopurinol safely and effectively optimizes tioguanine metabolites in inflammatory bowel disease patients not responding to azathioprine and mercaptopurine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22(5):441–446.**
583. Sparrow MP, Hande SA, Friedman S, Cao D, and Hanauer SB (2007). Effect of allopurinol on clinical outcomes in inflammatory bowel disease nonresponders to azathioprine or 6-mercaptopurine. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5(2):209–214.
- 584. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B, Vinner E, Marez D, Lo Guidice JM, Chevalier D, Brique S, Motte K, Colombel JF, et al. (1998a). Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br. J. Pharmacol.* 125(4):879–887.**
585. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysère H, Sabbagh N, Marez D, Vinner E, Chevalier ED, Lo Guidice JM, and Broly F (1998b). Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum. Mutat.* 12(3):177–185.
- 586. Stark AL, and Dolan ME (2013). Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomics: how applicable are they to clinical outcomes? *Pharmacogenomics* 14(5):447–450.**
- 587. Stark AL, Zhang W, Mi S, Duan S, O'Donnell PH, Huang RS, and Dolan ME (2010). Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics J.* 10(6):505–512.**
588. Stark AL, Hause RJ Jr, Gorsic LK, Antao NN, Wong SS, Chung SH, Gill DF, Im HK, Myers JL, White KP, et al. (2014). Protein quantitative trait Loci identify novel candidates modulating cellular response to chemotherapy. *PLoS Genet.* 10(4):e1004192.
589. Stefanescu C, Nuzzo A, Treton X, and Bouhnik Y (2011). Quels sont les enjeux de la cicatrisation muqueuse endoscopique dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales ? *Hépatogastro* 18(S4):22–26.
590. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, and Thomsen OO (2003). Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (4):CD000301.
591. Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Fontana M, Lionetti P, Decorti G, Malusà N, Bartoli F, Fezzi M, Giralaldi T, et al. (2005). TPMT genotype and the use of thiopurines in paediatric inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 37(12):940–945.
592. Stocco G, Martelossi S, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Montico M, Gotti A, and Ventura A (2007). Glutathione-S-transferase genotypes and the adverse effects of azathioprine in young patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13(1):57–64.
593. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, Yang W, Cheng C, Pui C-H, Relling MV, et al. (2009). Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 85(2):164–172.
594. Stocco G, Crews KR, and Evans WE (2010). Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. *Expert Opin. Drug Saf.* 9(1):23–37.
595. Stocco G, Yang W, Crews KR, Thierfelder WE, Decorti G, Londero M, Franca R, Rabusin M, Valsecchi MG, Pei D, et al. (2012). PACSIN2 polymorphism influences TPMT activity and mercaptopurine-related gastrointestinal toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 21(21):4793–4804.
596. Stow RA, and Bronk JR (1993). Purine nucleoside transport and metabolism in isolated rat jejunum. *J. Physiol.* 468:311–324.

597. Su C, Lichtenstein GR, Krok K, Brensinger CM, and Lewis JD (2004). A meta-analysis of the placebo rates of remission and response in clinical trials of active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126(5):1257–1269.
598. Su C, Lewis JD, Goldberg B, Brensinger C, and Lichtenstein GR (2007). A meta-analysis of the placebo rates of remission and response in clinical trials of active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 132(2):516–526.
599. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, et al. (2002). Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum. Genet.* 111(4-5):360–367.
600. Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk E, and Borgen L (1987). 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* 92(6):1894–1898.
601. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, Rongen GAPJM, van Schaik RHN, Schalekamp T, Touw DJ, et al. (2011). Pharmacogenetics: From Bench to Byte- An Update of Guidelines. Disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412232> [Accédé le :March 22, 2011].
602. Szalma S, Koka V, Khasanova T, and Perakslis ED (2010). Effective knowledge management in translational medicine. *J. Transl. Med.* 8:68.
603. Szumlanski CL, and Weinshilboum RM (1995). Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39(4):456–459.
- 604. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, Spurr N, Lennard L, Wieben E, and Weinshilboum R (1996). Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol.* 15(1):17–30.**
- 605. Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, and Weinshilboum RM (1992). Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 2(4):148–159.**

**- T - U -**

606. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, and Evans WE (1996). Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am. J. Hum. Genet.* 58(4):694–702.
- 607. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, Yanishevski Y, and Evans WE (1997). Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(12):6444–6449.**
608. Tanis AA (1998). Azathioprine in inflammatory bowel disease, a safe alternative? *Mediators Inflamm.* 7(3):141–144.
609. Tay B, Lilley R, Murray A, and Atkinson M (1969). Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 18(4):936–938.
610. Teichgräber U, Atreya I, Atreya R, Schwab M, and Neurath MF (2013). Infliximab treatment induces levels of the active azathioprine metabolite TGTP in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 19(4):E54–55.
611. Terdiman JP, Gruss CB, Heidelbaugh JJ, Sultan S, Falck-Ytter YT, and AGA Institute Clinical Practice and Quality Management Committee (2013). American Gastroenterological Association Institute guideline on the use of thiopurines, methotrexate, and anti-TNF- $\alpha$  biologic drugs for the induction and maintenance of remission in inflammatory Crohn's disease. *Gastroenterology* 145(6):1459–1463.
612. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ, and Egan LJ (2005). Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312(2):537–545.
613. Thompson AJ, Newman WG, Elliott RA, Roberts SA, Tricker K, and Payne K (2014). The cost-effectiveness of a pharmacogenetic test: a trial-based evaluation of TPMT genotyping for azathioprine. *Value Health J. Int. Soc. Pharmacoeconomics Outcomes Res.* 17(1):22–33.
614. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, and Chu G (2002). Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(10):6567–6572.
615. Tidd DM, and Paterson AR (1974). A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res.* 34(4):738–746.
- 616. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, et al. (2003). CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 111(8):1133–1145.**
617. Timmer A, McDonald JWD, and Macdonald JK (2007). Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* (1):CD000478.
618. Timmer A, McDonald JWD, Tsoulis DJ, and Macdonald JK (2012). Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 9:CD000478.
619. Travis S (2001). Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(11):1277–1279.
620. Travis SPL, Stange EF, Lémann M, Oresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, et al. (2006). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 55 Suppl 1:i16–35.
- 621. Treton X, Bouhnik Y, Mary J-Y, Colombel J-F, Duclos B, Soule J-C, Lerebours E, Cosnes J, and Lemann M (2009). Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 7(1):80–85.**
622. Turner D, Otley AR, Mack D, Hyams J, de Bruijne J, Uusoue K, Walters TD, Zachos M, Mamula P, Beaton DE, et al. (2007). Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 133(2):423–432.
623. Turner D, Travis SPL, Griffiths AM, Ruemmele FM, Levine A, Benchimol EI, Dubinsky M, Alex G, Baldassano RN, Langer JC, et al. (2011). Consensus for managing acute severe ulcerative colitis in children: a systematic review and joint statement from ECCO, ESPGHAN, and the Porto IBD Working Group of ESPGHAN. *Am. J. Gastroenterol.* 106(4):574–588.

Note : références majeures en gras



624. Turner D, Levine A, Escher JC, Griffiths AM, Russell RK, Dignass A, Dias JA, Bronsky J, Braegger CP, Cucchiara S, et al. (2012). Management of pediatric ulcerative colitis: joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 55(3):340–361.
625. Uchiyama K, Takagi T, Iwamoto Y, Kondo N, Okayama T, Yoshida N, Kamada K, Katada K, Handa O, Ishikawa T, et al. (2014). New genetic biomarkers predicting azathioprine blood concentrations in combination therapy with 5-aminosalicylic Acid. *PloS One* 9(4):e95080.
- 626. Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, and Hiratsuka M (2008). Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT\*2 - \*24). *Pharmacogenet. Genomics* 18(10):887–893.**

**- V - W - X - Y - Z -**

627. Vermeire S, Van Assche G, and Rutgeerts P (2004). C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 10(5):661–665.
- 628. Vermeire S, Van Assche G, and Rutgeerts P (2006). Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 55(3):426–431.**
629. Vernier-Massouille G, Cosnes J, Lemann M, Marteau P, Reinisch W, Laharie D, Cadot G, Bouhnik Y, De Vos M, Boureille A, et al. (2007). Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut* 56(10):1404–1409.
- 630. Vikingsson S, Carlsson B, Almer SHC, and Peterson C (2009). Monitoring of thiopurine metabolites in patients with inflammatory bowel disease-what is actually measured? *Ther. Drug Monit.* 31(3):345–350.**
631. Vikingsson S, Almer S, Peterson C, Carlsson B, and Josefsson M (2013). Monitoring of thiopurine metabolites - a high-performance liquid chromatography method for clinical use. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75:145–152.
632. Vincent AJ, Ren S, Harris LG, Devine DJ, Samant RS, Fodstad O, and Shevde LA (2012). Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance: NUPR1 and p21 in chemoresistance. *FEBS Lett.* 586(19):3429–3434.
633. Vogel F (1959). Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.* 12:52–125.
634. Vuchetich JP, Weinshilboum RM, and Price RA (1995). Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Genet. Epidemiol.* 12(1):1–11.
635. Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, and Kieff E (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J. Virol.* 64(5):2309–2318.
636. Wang L, Sun J, Horvat M, Koutalistras N, Johnston B, and Ross Sheil AG (1996). Evaluation of MTS, XTT, MTT and 3HTdR incorporation for assessing hepatocyte density, viability and proliferation. *Methods Cell Sci.* 18(3):249–255.
637. Wang L, Sullivan W, Toft D, and Weinshilboum R (2003). Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: chaperone protein association and allozyme degradation. *Pharmacogenetics* 13(9):555–564.
- 638. Wang L, Pelleymounter L, Weinshilboum R, Johnson JA, Hebert JM, Altman RB, and Klein TE (2010). Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenet. Genomics* 20(6):401–405.**
639. Wang W, Wang EQ, and Balthasar JP (2008). Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(5):548–558.
640. Warman JI, Korelitz BI, Fleisher MR, and Janardhanam R (2003). Cumulative experience with short- and long-term toxicity to 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 37(3):220–225.
641. Weinshilboum R, and Wang L (2004). Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(9):739–748.
- 642. Weinshilboum RM, and Sladek SL (1980). Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 32(5):651–662.**
643. Welsh M, Mangravite L, Medina MW, Tantisira K, Zhang W, Huang RS, McLeod H, and Dolan ME (2009). Pharmacogenomic discovery using cell-based models. *Pharmacol. Rev.* 61(4):413–429.
644. Weng L, Ziliak D, Im HK, Gamazon ER, Philips S, Nguyen AT, Desta Z, Skaar TC, Consortium on Breast Cancer Pharmacogenomics (COBRA), Flockhart DA, et al. (2013). Genome-wide discovery of genetic variants affecting tamoxifen sensitivity and their clinical and functional validation. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 24(7):1867–1873.
645. Wennerstrand P, Mårtensson L-G, Söderhäll S, Zimdahl A, and Appell ML (2013). Methotrexate binds to recombinant thiopurine S-methyltransferase and inhibits enzyme activity after high-dose infusions in childhood leukaemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69(9):1641–1649.
646. Wheeler HE, and Dolan ME (2012). Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation. *Pharmacogenomics* 13(1):55–70.

Note : références majeures en gras

647. Wheeler HE, Gamazon ER, Stark AL, O'Donnell PH, Gorsic LK, Huang RS, Cox NJ, and Dolan ME (2013). Genome-wide meta-analysis identifies variants associated with platinating agent susceptibility across populations. *Pharmacogenomics J.* 13(1):35–43.
648. WHO (2006). WHO | Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. Disponible sur : [http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis\\_diabetes2006/en/index.html](http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/index.html) [Accédé le : January 28, 2013].
649. WHO (2011). WHO | Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Disponible sur : <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/en/index.html> [Accédé le : January 29, 2013].
650. Wilke RA, Xu H, Denny JC, Roden DM, Krauss RM, McCarty CA, Davis RL, Skaar T, Lamba J, and Savova G (2011). The emerging role of electronic medical records in pharmacogenomics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(3):379–386.
651. Woodson LC, and Weinshilboum RM (1983). Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. *Biochem. Pharmacol.* 32(5):819–826.
652. Woodson LC, Dunnette JH, and Weinshilboum RM (1982). Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222(1):174–181.
653. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, and Weinshilboum RM (1983). Thiopurine methyltransferase. Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol. Pharmacol.* 24(3):471–478.
654. Wright S, Sanders DS, Lobo AJ, and Lennard L (2004). Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut* 53(8):1123–1128.
655. Wrobleva K, Kolorz M, Batovsky M, Zboril V, Suchankova J, Bartos M, Ulicny B, Pav I, and Bartosova L (2012). Gene polymorphisms involved in manifestation of leucopenia, digestive intolerance, and pancreatitis in azathioprine-treated patients. *Dig. Dis. Sci.* 57(9):2394–2401.
656. Wu T-Y, Fridley BL, Jenkins GD, Batzler A, Wang L, and Weinshilboum RM (2011). Mycophenolic acid response biomarkers: a cell line model system-based genome-wide screen. *Int. Immunopharmacol.* 11(8):1057–1064.
657. Xie J, Techritz S, Haebel S, Horn A, Neitzel H, Klose J, and Schuelke M (2005). A two-dimensional electrophoretic map of human mitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: a prerequisite to study mitochondrial disorders in patients. *Proteomics* 5(11):2981–2999.
658. Xin H, Fischer C, Schwab M, and Klotz U (2005). Effects of aminosalicylates on thiopurine S-methyltransferase activity: an ex vivo study in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21(9):1105–1109.
659. Xu H, Stenner SP, Doan S, Johnson KB, Waitman LR, and Denny JC (2010). MedEx: a medication information extraction system for clinical narratives. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 17(1):19–24.
660. Yan L, Zhang S, Eiff B, Szumlanski CL, Powers M, O'Brien JF, and Weinshilboum RM (2000). Thiopurine methyltransferase polymorphic tandem repeat: genotype-phenotype correlation analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 68(2):210–219.
661. Yan T, Berry SE, Desai AB, and Kinsella TJ (2003). DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9(6):2327–2334.
662. Yang S-K, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, Haritunians T, Ye BD, Kim K-J, Park SH, et al. (2014). A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat. Genet.*
- 663. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, Relling MV, and Evans WE (1997). Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann. Intern. Med.* 126(8):608–614.**
664. Zapletal E, Rodon N, Grabar N, and Degoulet P (2010a). Methodology of integration of a clinical data warehouse with a clinical information system: the HEGP case. *Stud Health Technol Inf.* 160:193–197.
665. Zapletal E, Rodon N, Grabar N, and Degoulet P (2010b). Methodology of integration of a clinical data warehouse with a clinical information system: the HEGP case. *Stud. Health Technol. Inform.* 160(Pt 1):193–197.

666. Zaza G, Cheok M, Yang W, Panetta JC, Pui C-H, Relling MV, and Evans WE (2005). Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after in vivo mercaptopurine treatment. *Blood* 106(5):1778–1785.
- 667. Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, McLeod H, Weinshilboum RM, Relling MV, Evans WE, et al. (2010). Thiopurine pathway. *Pharmacogenet. Genomics* 20(9):573–574.**
668. Zech CJ, Seiderer J, Reinisch W, Ochsenkuhn T, Schima W, Diebold J, Wrba F, Reiser MF, and Schoenberg SO (2007). Thioguanin-induced nodular regenerative hyperplasia of the liver-ROC analysis of different MR techniques. *Eur. Radiol.* 17(7):1898–1905.
669. Zelinkova Z, Derijks LJJ, Stokkers PCF, Vogels EWM, van Kampen AHC, Curvers WL, Cohn D, van Deventer SJH, and Hommes DW (2006). Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine-induced myelosuppression. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4(1):44–49.
670. Zhang L, Hong K, Zhang J, and Pagano JS (2004). Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323(1):141–152.
671. Zhang W, Duan S, Kistner EO, Bleibel WK, Huang RS, Clark TA, Chen TX, Schweitzer AC, Blume JE, Cox NJ, et al. (2008). Evaluation of genetic variation contributing to differences in gene expression between populations. *Am. J. Hum. Genet.* 82(3):631–640.
672. Zhang W, Modén O, and Mannervik B (2010). Differences among allelic variants of human glutathione transferase A2-2 in the activation of azathioprine. *Chem. Biol. Interact.* 186(2):110–117.
673. Zimm S, Collins JM, Riccardi R, O'Neill D, Narang PK, Chabner B, and Poplack DG (1983). Variable bioavailability of oral mercaptopurine. Is maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukemia being optimally delivered? *N. Engl. J. Med.* 308(17):1005–1009.
674. Zlabek JA, Wickus JW, and Mathiason MA (2011). Early cost and safety benefits of an inpatient electronic health record. *J. Am. Med. Inform. Assoc. JAMIA* 18(2):169–172.
675. (2008). Community cleverness required. *Nature* 455(7209):1.
676. (2011). Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease (Washington (DC): National Academies Press (US)).
677. (2014). Gertrude B. Elion. Disponible sur : [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gertrude\\_B.\\_Elion&oldid=627728752](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gertrude_B._Elion&oldid=627728752) [Accédé le :May 18, 2014].
678. WHO | International Classification of Diseases (ICD). Disponible sur : <http://www.who.int/classifications/icd/en/> [Accédé le :January 5, 2013].
679. Cimzia Approved in the US for the Treatment of Moderate to Severe Crohn's Disease. Disponible sur : <http://www.drugs.com/newdrugs/cimzia-approved-us-moderate-severe-crohn-s-951.html> [Accédé le :July 18, 2014].

